

---

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

---

**XILANASE DE *Penicillium chrysogenum*: PRODUÇÃO EM UM RESÍDUO  
AGROINDUSTRIAL, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS**

**CÁROL CABRAL TERRONE**

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

**Junho - 2013**

CÁROL CABRAL TERRONE

**XILANASE DE *Penicillium chrysogenum*: PRODUÇÃO EM UM RESÍDUO  
AGROINDUSTRIAL, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

Rio Claro  
Junho – 2013

547.758 Terrone, Cárol Cabral  
T328x Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção em um  
resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas  
/ Cárol Cabral Terrone. - Rio Claro, 2013  
77 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Eleonora Cano Carmona

1. Enzimas. 2. Xilanases. 3. Enzimas microbianas. 4.  
Bagaço de cana-de-açúcar. 5. Produção de enzimas. 6.  
Purificação de enzimas. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE RIO CLARO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** XILANASE DE *Penicillium chrysogenum*: PRODUÇÃO EM UM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL, PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES

**AUTORA:** CÁROL CABRAL TERRONE

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP

Prof. Dr. HAMILTON CABRAL

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade de São Paulo

Profa. Dra. MARCIA REGINA BROCHETTO BRAGA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP

Data da realização: 13 de maio de 2013.

## **Dedico**

Aos meus pais Alvaro e Lenita

À minha irmã Adriana

Pilares da minha vida...  
Fundamentais... indispensáveis...  
Amor indescritível!

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona, pela orientação deste trabalho, por tudo que tem me ensinado, pelo carinho, confiança e amizade.

À Carmen Silvia Casonato de Souza, pela amizade, pelo apoio técnico, que contribuiu grandemente para a realização deste trabalho, pela paciência e pela agradável convivência.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues pela identificação da linhagem de *Penicillium chrysogenum*.

Ao Prof. Dr. César Rafael Fanchini Terrasan e ao Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida por toda ajuda, pelas sugestões e colaborações para realização deste trabalho, pela companhia e amizade.

À Fabiana Cristina Fuzaro Novaes, pela grande ajuda em diversas etapas desse trabalho, pela companhia nas tardes mais divertidas do Lab. 1, pelo carinho e pela grande amizade.

Aos amigos do laboratório Daniela Turati, Beatriz Temer, Diogo Hirano e Alexandre Videira, e a todos os que passaram pelo Lab. 1 durante esse período, pela ajuda e pelo agradável convívio diário.

Aos meus pais, Alvaro e Lenita, pelo apoio durante todos esses anos de estudos (que não foram poucos), pela força, amparo, cuidado, carinho e amor. Porque tudo o que sou e tudo o que sei devo a vocês.

À minha irmã Adriana, por toda a ajuda, pela paciência comigo e pela amizade, cumplicidade e amor que temos compartilhado desde sempre.

Aos meus avós Antônio e Maria, por todo amor que sempre me deram.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, especialmente à Tia Cláudia pela amizade, carinho e por estar sempre presente.

À minha grande amiga Talita Bonato Almeida por estar sempre comigo. Neoqav!

Aos queridos Augusto Marino, Camila Mura Pereira, Cleiton Márcio Braga, Dérick Rocumback, Fabiano Romão, Fernanda Nara Maurício, Daniel Castro, Gabriela Koyama, Luis Guilherme Virgílio, Marcus Silva, Priscila Kiyuna e Rodolfo Duarte Ferreira, por serem minha segunda família. Pelo apoio, pela diversão, pelo amor e carinho... que a nossa amizade possa nos manter sempre unidos!

A todo corpo docente, técnicos e colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e demais setores da UNESP – Rio Claro.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E principalmente a Deus por esse trabalho, pela minha família, pelos amigos, pela luz e paciência, por todo amor, por Sua Graça, pela vida eterna...



" Foi o tempo que dedicaste à tua rosa  
que fez tua rosa tão importante."  
(Antoine de Saint-Exupéry)

## Resumo

Neste trabalho, uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* foi utilizada para produzir xilanases utilizando um resíduo agroindustrial como substrato. O principal objetivo foi melhorar a produção da xilanase, verificando a influência de diferentes substratos, agitação, pH e temperatura de cultivo. A linhagem foi cultivada em meio líquido de Vogel suplementado com diversos substratos puros como a xilose, glicose, xilano de aveia, Avicel e carboximetilcelulose (CMC), e complexos como farelo de trigo, farelo de aveia, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cevada, casca de laranja e sabugo de milho. Testes granulométricos com bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de cevada foram realizados para avaliar a influência dessa característica sobre a produção de xilanase. A melhor produção foi obtida com bagaço de cana-de-açúcar a 1% (m/v) com granulometria entre 2-1 mm. Nos ensaios cinéticos a melhor produção foi obtida em cultivos estáticos, por 8 dias, sendo produzida quantidade duas vezes maior de enzima do que em cultivos agitados. O melhor pH de cultivo para a produção de xilanases foi de 5,0 e a temperatura de 20 °C. A enzima foi purificada por uma estratégia de duas etapas, sendo uma cromatografia de troca iônica e outra de filtração em gel, apresentando ao final uma recuperação de 18,8% com um fator de purificação de 24,9. As propriedades da enzima bruta e da purificada foram pH ótimo de 6,0 e 6,5, respectivamente, e a temperatura ótima para ambas de foi a 45 °C. As meias vidas a 40, 45, 50, 55 e 60 °C, para a xilanase bruta foram de 37, 28, 16, 2, e 1 minuto e para a xilanase purificada foram de 35, 31, 10, 3 e 2 minutos, respectivamente. A maior estabilidade ao pH da enzima bruta ocorreu em pH 6,0 e também se mostrou estável na região alcalina, entre 8,0 e 10,0; já a enzima purificada apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 10,0. A atividade xilanase, presente no filtrado bruto e da enzima purificada, sofreu inibição na presença de alguns íons metálicos, como  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Pb}^{+2}$  e teve sua atividade aumentada na presença de agentes redutores como DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol.



## Abstract

In this work, a strain of *Penicillium chrysogenum* has been used to produce xylanases using agroindustrial waste as substrate. The main objective was to improve the production of xylanase, by checking the influence of substrate, agitation, pH and temperature of cultivation. The strain was cultivated in liquid Vogel's medium supplemented with various substrates as pure xylose, glucose, oat xylan, Avicel and carboxymethylcellulose (CMC), and complexes such as wheat bran, oat bran, sugar cane bagasse, brewers spent grain, orange peel and corncob. Granulometric tests with crushed sugar cane bagasse and brewers spent grain were conducted to evaluate the influence of this characteristic on production of xylanase. The best production was obtained with crushed sugar cane bagasse to 1% (w/v) with particle size between 2-1 mm. In kinetic experiments, the best production was obtained in static cultivation for 8 days, which is produced twice as much enzyme in agitated cultures. The best pH cultivation for the production of xylanase was pH 5.0 and temperature of 20 °C. The enzyme was purified by a two-step strategy, being a ion exchange chromatography and a gel filtration, presenting the ultimate recovery of 18,8% with a purification factor of 24,9. The properties of the crude enzyme and purified were optimum pH of 6,0 and pH 6.5, respectively, and the temperature was great for both of 45 °C. The half of 40, 45, 50, 55 and 60 ° C for xylanase crude were 37, 28, 16, 2, 1 minutes and for the xylanase purified were 35, 31, 10, 3 and 2 minutes, respectively. The increased stability at the pH of the crude enzyme was at pH 6,0 and also stable in the alkaline region, between 8.0 and 10.0, whereas the purified enzyme was most stable in the range of 4.5 to 10.0. The xylanase activity present in crude filtrate and purified enzyme, suffered inhibition in the presence of certain metal ions, such as  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Pb}^{+2}$  and had its increased activity in the presence of reducing agents such as DTT and  $\beta$ -mercaptoethanol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
Figura 1. Estrutura geral do xilano .....	16
Figura 2. Representação de tipos de xilanos .....	17
Figura 3. Enzimas que participam do complexo xilanolítico.....	19
Figura 4. Representação de conidióforo.....	28
Figura 5. Colônias e conidióforo de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	29
Figura 6. Cinética de produção de xilanase por <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	43
Figura 7. Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de xilanase .....	46
Figura 8. Influência da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanase .....	48
Figura 9. Perfil cromatográfico em CM- Sephadex C-50 .....	51
Figura 10. Perfil cromatográfico de exclusão molecular em G-100 .....	52
Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	53
Figura 12. Efeito do pH de reação sobre a atividade xilanase .....	56
Figura 13. Efeito da temperatura de reação sobre a atividade xilanase .....	58
Figura 14. Estabilidade térmica da xilanase .....	60
Figura 15. Estabilidade a diferentes pHs da xilanase .....	62

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1. Granulometria do substrato .....	34
Tabela 2. Influência do substrato sobre a produção de xilanase .....	40
Tabela 3. Influência da granulometria do substrato sobre a produção de xilanase .....	42
Tabela 4. Teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH .....	50
Tabela 5. Purificação da xilanase .....	54
Tabela 6. Efeito de substâncias sobre a atividade xilanase .....	64
Tabela 7. Comparação de xilanases de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	66

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Hemiceluloses – Xilano .....	14
1.2 Xilanases .....	17
1.3 Ocorrência e regulação de xilanases .....	20
1.4 Aplicação de xilanases .....	22
1.5 Fermentação submersa .....	26
1.6 Resíduos agroindustriais .....	27
1.7 O gênero <i>Penicillium</i> e a espécie <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	28
2 OBJETIVOS .....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.1 Linhagem, cultivo e manutenção .....	32
3.2 Obtenção do filtrado de cultura e extração do conteúdo intracelular .....	32
3.3 Determinação da atividade xilanase .....	33
3.4 Determinação de proteínas .....	33
3.5 Produção de xilanase por <i>Penicillium chrysogenum</i> em fermentação submersa .....	33
3.5.1 Influência do substrato sobre a produção de xilanase .....	33
3.5.2 Influência da granulometria do substrato sobre a produção de xilanase .....	34
3.5.3 Cinética de produção de xilanase .....	34
3.5.4 Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de xilanase .....	35
3.5.5 Influência da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanase .....	35
3.6 Purificação da xilanase produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	35
3.6.1 Ensaio do teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH.....	35
3.6.2 Cromatografia de troca iônica .....	36
3.6.3 Cromatografia de exclusão molecular .....	36
3.7 Eletroforese em condição denaturante .....	36

	<b>Página</b>
3.8 Caracterização da xilanase bruta e purificada .....	37
3.8.1 Influência do pH sobre a atividade xilanase .....	37
3.8.2 Influência da temperatura sobre a atividade xilanase .....	37
3.8.3 Estabilidade térmica da atividade xilanase .....	37
3.8.4 Estabilidade da atividade xilanase em diferentes pHs.....	38
3.8.5 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre a atividade xilanase .....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1 Produção de xilanase por <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	39
4.1.1 Influência do substrato .....	39
4.1.2 Influência da composição granulométrica do substrato .....	41
4.1.3 Cinética de produção de xilanase .....	42
4.1.4 Influência do pH do meio de cultivo .....	44
4.1.5 Influência da temperatura de cultivo .....	47
4.2 Purificação da xilanase produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	49
4.2.1 Ensaio do teste em tubo .....	49
4.2.2 Cromatografia de troca iônica .....	50
4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel .....	52
4.3 Caracterização da xilanase bruta e da purificada .....	55
4.3.1 Efeito do pH e da temperatura de reação sobre a atividade xilanase .....	55
4.3.2 Estabilidade a temperatura e ao pH da atividade xilanase .....	59
4.3.3 Efeito de substâncias e íons .....	63
4.4 Comparação das propriedades de xilanases isoladas de diferentes linhagens de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	65
5 CONCLUSÕES .....	67
6 REFERÊNCIAS .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o estudo de bioprocessos tem conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais vantajosas e mais “verdes” em relação aos processos químicos convencionais.

As enzimas constituem importantes bioprodutos de interesse da indústria, pois apresentam alto grau de especificidade nas suas reações, o que aumenta a eficiência dos processos nos quais estão inseridas. Além disso, a aplicação de enzimas minimiza a utilização de compostos químicos e a liberação de substâncias poluentes e/ou tóxicas ao ambiente. O uso de resíduos agroindustriais como substrato na produção de enzimas xilanolíticas, reduz o preço final do extrato enzimático obtido, por serem mais acessíveis economicamente, e por apresentarem muitas substâncias de alto valor biológico; com a tecnologia adequada estes materiais podem ser reciclados e convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

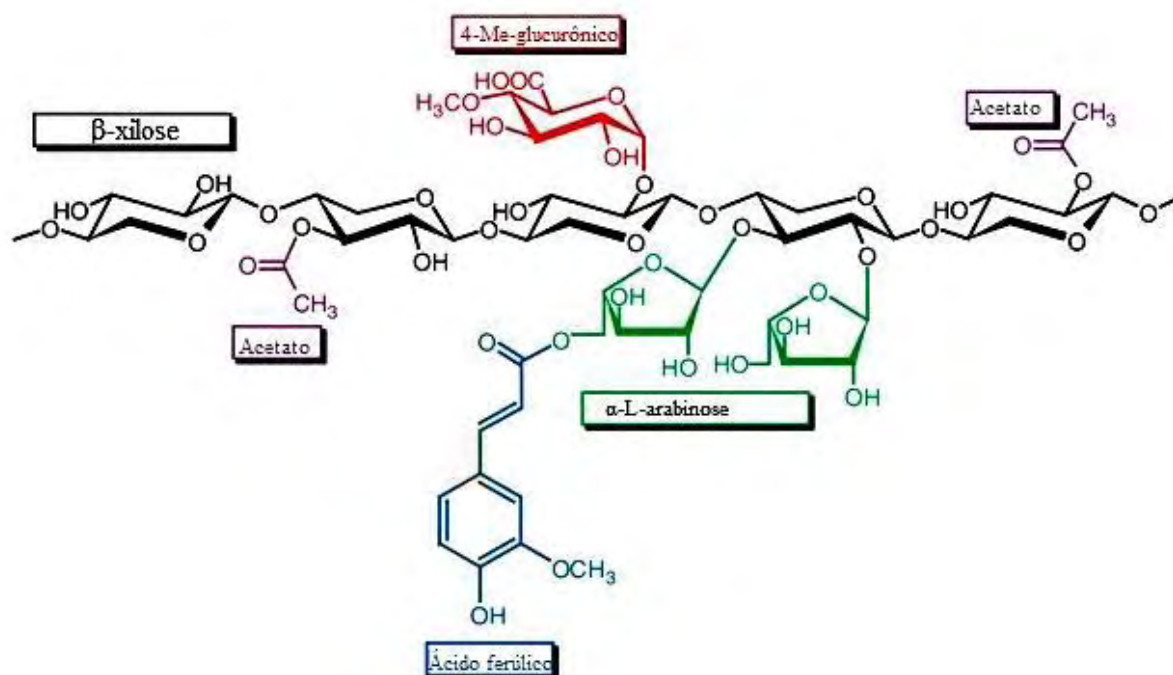
Nesse contexto, o presente trabalho buscou o aproveitamento adequado de resíduos agroindustriais, com o uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de xilanase, por uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* isolada de solo sob cerrado. O melhoramento da produção de enzimas xilanolíticas, em resíduos lignocelulósicos, é uma alternativa viável na substituição de substratos puros, e permite a obtenção dessas enzimas para serem aplicadas em diversos setores, e também purificadas e caracterizadas, para a identificação das características e o conhecimento das propriedades das xilanases produzidas.

### 1.1 Hemiceluloses - Xilano

O material lignocelulósico é composto por celulose, hemicelulose e lignina, um composto aromático (MCNEILL et al., 1984; GILBERT, HAZLEWOOD, 1993). Na estrutura da parede celular de plantas, a celulose, a hemicelulose e a lignina, interagem através de ligações covalentes e não-covalentes. As hemiceluloses se associam as fibrilas de celulose, na matriz da parede celular, e, juntamente com a lignina, formam uma estrutura rígida que mantém a integridade da parede celular vegetal (TIMEL, 1967; COLLINS et al., 2005; DEUTSCHMAN, DEKKER, 2012).

As hemiceluloses são uma classe heterogênea de polissacarídeos não celulósicos, que representam de 25 a 35% da maioria dos materiais vegetais e sua estrutura pode conter pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -D-galactose) e /ou ácidos urônicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metil-galacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico) (WOODWARD, 1984; HOWARD, et al., 2003; EBRINGEROVA et al., 2005; DEUTSCHMAN, DEKKER, 2012). Outros açúcares, como a  $\alpha$ -L-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades, e os grupos hidroxila dos monossacarídeos podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil (HOWARD et al. 2003; GÍRIO et al., 2010). As hemiceluloses são compostas por uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares ou ramificadas, que são classificados de acordo com o principal monossacarídeo presente na sua composição. Os principais constituintes do grupo das hemiceluloses são xilano, manano, galactano e arabinano (BEG et al., 2001; FILHO, 2004).

O xilano é a principal classe de hemicelulose presente na parede celular vegetal, e é a mais abundante, representando de 5 a 15% da biomassa de madeira de folhosas, e até 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais (KULKARNI et al., 1999; COLLINS et al., 2005; EBRINGEROVA et al., 2005; DEUTSCHMAN, DEKKER, 2012). Em plantas, geralmente, o xilano apresenta-se altamente ramificado, com uma grande variedade de estruturas, dependendo das diferentes espécies vegetais (KULKARNI et al., 1999; COLLINS et al., 2005).

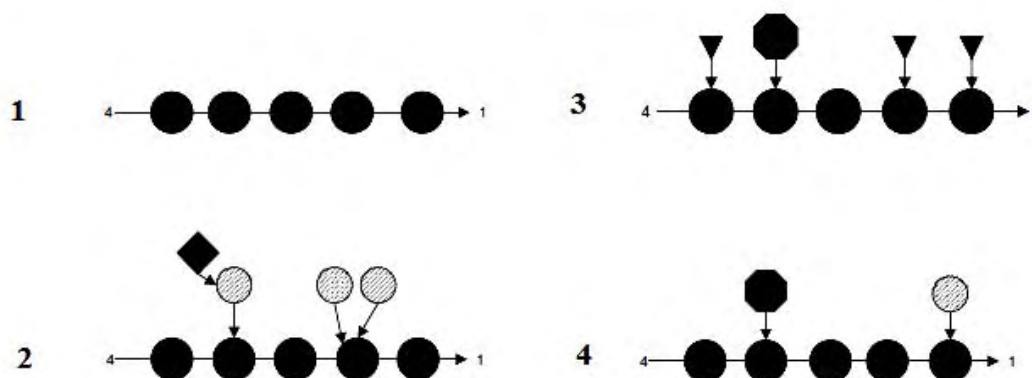


**Figura 1:** Estrutura geral do xilano mostrando as possíveis ligações encontradas na parede celular de plantas (DODD, CANN, 2010)

A cadeia principal do xilano é homopolimérica, composta por resíduos de D-xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,4, que podem ser parcialmente substituídos por grupos O-acetil nas posições O-2 e/ou O-3, sendo que as ramificações podem ser compostas por  $\alpha$ -L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, e ainda ácidos ferúlico e  $\rho$ -cumárico ligados aos resíduos de L-arabinose (Figura 1) (WHISTLER, RICHARDS, 1970; EBRINGEROVA, HEINZE, 2000; COLLINS et al., 2005; DODD, CANN, 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012). O seu grau de polimerização varia de 50 a 185 em xilanos de gramíneas, cereais e madeiras de coníferas e de 150 a 200 em xilanos de folhosas (FILHO, 2004; GÍRIO et al., 2010).

A diversidade estrutural do xilano está relacionada à sua funcionalidade na parede celular vegetal, o que pode explicar a distribuição dos diferentes tipos de xilanos no reino das plantas. De acordo com os substituintes encontrados na cadeia principal do xilano, este pode ser classificado em homoxilano, presente em algas, arabinoxilano, presente em cereais, glucuronoxilano presente em madeira de folhosas e arabinoglucuronoxilano, presente em gramíneas, cereais e madeira de coníferas (KULKARNI et al., 1999; de VRIES, VISSER, 2001; DODD, CANN, 2010; GÍRIO et al., 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012). A Figura 2 representa algumas estruturas químicas de diferentes tipos de xilanos.





**Figura 2:** Principais tipos de xilanos. 1- homoxilanos; 2- arabinoxilanos; 3- glucuronoxilanos; 4- arabinoglucuronoxilanos. ● xilose; ○ arabinose; ◆ feruloil; ▼ acetil; ● 4-O-metil-D-glucurônico (adaptado de GÍRIO et al., 2010)

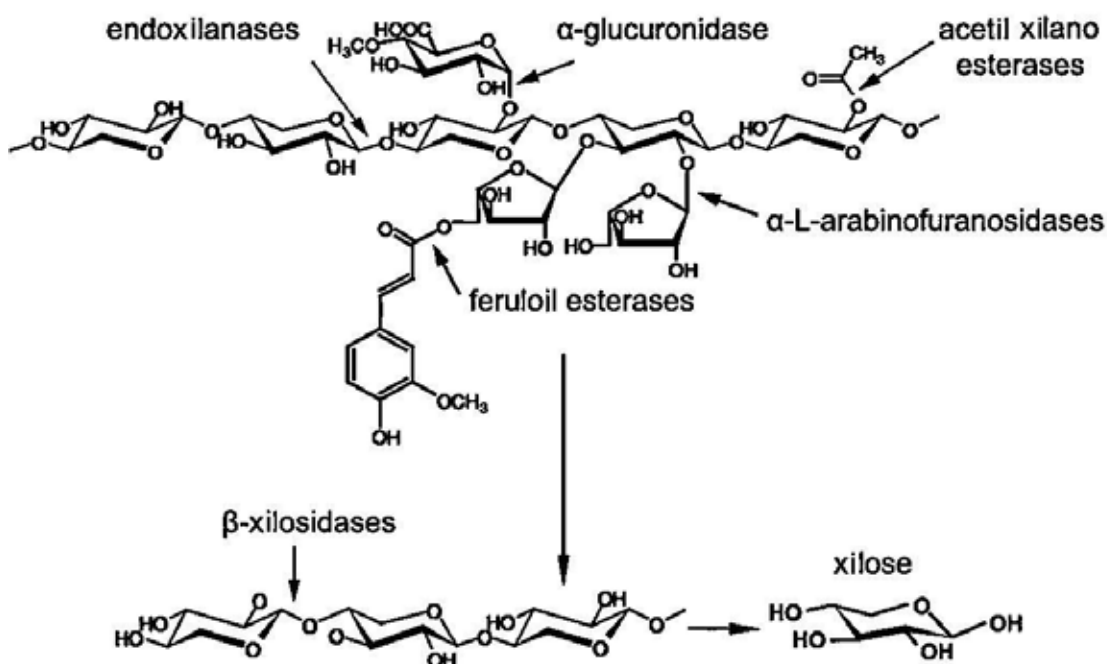
A cadeia lateral do polímero determina a solubilidade, conformação física e a reatividade da molécula de xilano com os demais componentes hemicelulósicos (BIELY, 1985; KULKARNI et al., 1999; FILHO, 2004). Na maioria das espécies de plantas, o xilano encontra-se numa forma parcialmente acetilada, mas em alguns casos, como os xilanos de madeira, estes são altamente acetilados (KULKARNI et al., 1999; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). A presença dos grupos acetil, tornam o xilano significativamente mais solúvel em água (BIELY, 1985; FILHO, 2004; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997), sendo que os grupos acetil são facilmente removidos, quando o xilano é submetido a extração alcalina (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

## 1.2 Xilanases

As xilanases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal do xilano, reduzindo o grau de polimerização do substrato (BIELY, 1985; HOWARD et al., 2003; POLIZELI et al., 2005; GRAY et al., 2006). As xilanases, também denominadas como endo-1,4- $\beta$ -xilanases ou 1,4- $\beta$ -D-xilano-hidrolases (EC 3.2.1.8), são as principais enzimas envolvidas na degradação do xilano (PRADE, 1995; COLLINS et al., 2005; de VRIES, VISSER, 2001; GÍRIO et al., 2010)

A molécula de xilano não é atacada aleatoriamente, mas os sítios selecionados para hidrólise dependem da natureza do substrato, do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e do número de substituintes (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010). Para a completa e eficiente biodegradação da estrutura do xilano, é indispensável a atuação das xilanases conjuntamente com outras enzimas do complexo xilanolítico (Figura 3). Essas enzimas hidrolíticas acessórias se fazem necessárias para clivar as diversas cadeias laterais da estrutura do xilano (DODD, CANN, 2010).

As principais enzimas que atuam em conjunto com as xilanases e participam dessa degradação são as acetil xilano esterases (EC 3.1.1.72), que removem os grupos O-acetil, e as esterases dos ácidos ferúlico (EC 3.1.1.73) e  $\rho$ -cumárico (EC 3.1.1), que hidrolisam as ligações ésteres desses componentes nas cadeias laterais do xilano (DODD, CANN, 2010). Os oligômeros formados tornam-se substratos para as glucuronidasas (EC 3.2.1.139), que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,2 do ácido glucurônico com os resíduos de xilose, e para as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), que removem os resíduos de L-arabinoses substituídos na estrutura do xilano, restando assim, apenas xilooligossacarídeos curtos não ramificados (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005; DODD, CANN, 2010; GÍRIO et al., 2010). Os xilooligossacarídeos formados poderão então ser reduzidos à mono, di e trissacarídeos de xilose pelas  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37) (PRADE, 1995; GILBERT, 2010; DODD, CANN, 2010). As  $\beta$ -xilosidasas apresentam afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos curtos e liberam monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora de xilooligossacarídeos (DODD, CANN, 2010).



**Figura 3:** As diversas enzimas que participam do complexo xilanólico. As setas indicam onde cada uma das enzimas atua na molécula de xilano (SUN et al., 2012).

As xilanases ocorrem em múltiplas formas, podendo ser expressas como produtos de genes distintos ou serem resultantes do processamento diferencial do RNA mensageiro (COLLINS et al., 2005). A ocorrência de enzimas glicosiladas é um fenômeno comum entre muitas xilanases eucarióticas (KULKARNI et al., 1999).

As xilanases são distribuídas em famílias, de acordo com o sistema de classificação das glicosil hidrolases, que consta no banco de dados Cazy (Carbohydrate-Active enzymes), de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos. Criada em 1991, esta base de dados apresenta a classificação e as informações a respeito das enzimas envolvidas na síntese, no metabolismo e no transporte de carboidratos. As famílias estão agrupadas em 14 clãs distintos que compartilham semelhanças estruturais. O banco de dados Cazy contém, atualmente, 94 famílias de glicosil transferases, 22 famílias de polissacarídeo-liases e 16 famílias de polissacarídeo-esterases (CANTAREL, et al., 2009; Cazy: <http://www.cazy.org/>).

As xilanases pertencem principalmente às famílias GH 10 e 11, mas enzimas com atividade xilanase também têm sido classificadas nas famílias GH 5, 7, 8 e 43, por apresentarem diferenças em seus domínios catalíticos, em suas propriedades físico-químicas,

em sua estrutura, modo de ação e especificidade por substratos (COLLINS et al., 2005; DODD, CANN, 2010).

As xilanases pertencentes à família GH 10 apresentam em sua estrutura tridimensional quatro ou cinco subsítios, sendo que seus produtos da hidrólise apresentam resíduos de arabinose em sua extremidade redutora. As xilanases da família GH 11 apresentam pelo menos sete subsítios, e seus produtos de hidrólise apresentam resíduos de arabinose na penúltima xilose da extremidade redutora (DODD, CANN, 2010)

As xilanases pertencentes à família GH 10 tem como características massa molecular maior que 30 kDa e maior atividade em pH ácido, enquanto que, as provenientes da família GH 11, apresentam maior atividade em pH básico, massa molecular abaixo de 30 kDa e são ativas exclusivamente sobre substratos que contenham xilose (FILHO, 2004; COLLINS et al., 2005). Os métodos utilizados para a compreensão do modo de ação de xilanases são as análises de cinética de hidrólise e determinações do produto final da hidrólise de xilanos, que podem ser feitas por espectrometria de massas, por exemplo. Essas análises permitem diferenciar os diversos tipos de xilanohidrolases e identificar os sítios de clivagem das xilanases (KULKARNI et al., 1999; DODD, CANN, 2010)

### **1.3 Ocorrência e regulação de xilanases**

Enzimas xilanolíticas são produzidas por diversos organismos, como, bactérias aeróbias e anaeróbias, leveduras, fungos mesofílicos, termofílicos e extremofílicos, algas marinhas, protozoários, moluscos, crustáceos, insetos, sementes, entre outros. (BIELY et al., 1985; SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997; FILHO, 2004; COLLINS et al., 2005). A maioria dos micro-organismos, que utilizam substratos contendo xilano, produzem xilanases, pois apresentam um conjunto de genes que são expressos em resposta à presença de determinados substratos. Dependendo do organismo, as enzimas podem permanecer no interior da célula, na membrana celular ou ser secretada para fora da célula, para o meio extracelular (PRADE, 1995). Os fungos filamentosos são os principais produtores de xilanases, uma vez que secretam as enzimas para o meio externo, em níveis muito mais elevados do que os de leveduras e bactérias (KULKARNI et al., 1999).

A regulação da produção do complexo xilanolítico pode ser independente da expressão de outras enzimas; durante o crescimento em xilano, os fungos filamentosos produzem xilanases e pouca ou nenhuma quantidade de celulase. Porém, na presença de celulose os organismos produzem celulases associadas à xilanases (BIELY, 1985; POLIZELI

et al., 2005). As xilanases são, geralmente, enzimas induzíveis, porém a produção constitutiva de xilanase também tem sido verificada (BEG et al., 2001; ARO et al., 2005). Os fungos filamentosos possuem uma grande diversidade de mecanismos de controle celular (BIELY, 1985). Os mecanismos que regulam a formação de enzimas extracelulares, com base na fonte de carbono presente no meio, são influenciados pela disponibilidade de precursores para a síntese de xilanases (ARO et al., 2005). A molécula de xilano, por ser uma estrutura polimérica, não é capaz de penetrar na célula microbiana, então, geralmente, fragmentos menores, xilooligossacarídeos de baixo peso molecular, são formados pela ação de pequenas quantidades de xilanases constitutivas secretadas no meio extracelular; estes oligossacarídeos são transportados para dentro da célula, por permeases, e induzem a expressão dos genes envolvidos na síntese de xilanases (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999; ARO et al. 2005; COLLINS et al., 2005). A xilose e alguns xilooligossacarídeos são indutores da produção de xilanase (PRADE, 1995; HALTRICH et al., 1996; FILHO, 2004), mas geralmente, os açúcares prontamente metabolizáveis, tais como a glicose, atuam como repressores da síntese de xilanase (GÍRIO et al., 2010). A repressão catabólica por glicose é um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanase (GÍRIO et al., 2010). A indução de xilanase em fungos filamentosos é um fenômeno complexo e o nível de resposta varia para cada micro-organismo. Um substrato que induz a produção de xilanase em uma espécie, pode ser um inibidor da produção em outra espécie (FILHO, 2004).

A produção de xilanase pode ser induzida também por materiais lignocelulósicos como farelo de trigo, palha de arroz, sabugo de milho e bagaço de cana (BEG et al., 2001; GÍRIO et al., 2010).

Xilanases, produzidas por microrganismos, tem sido amplamente utilizadas durante as últimas décadas, por causa de suas potenciais aplicações em diversos setores da indústria (SOUNDARI, SASHI, 2009). *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma koningii*, dentre outras espécies, tem sido manipuladas para a produção de xilanases comerciais (COLLINS et al., 2005).

#### 1.4 Aplicações de xilanases

As xilanases apresentam grande diversidade de características bioquímicas, e esta variedade permite a aplicação destas enzimas em diferentes processos biotecnológicos. Essas enzimas são comumente utilizadas em muitas aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis e com propriedades específicas, vem crescendo nos últimos anos (GODFREY, WEST, 1996). O estudo biotecnológico de hemicelulases teve início na década de 80, em aplicações na indústria de alimentos. Posteriormente, estas enzimas começaram a ser utilizadas na indústria têxtil e de papel e celulose (WONG, SADDLER, 1992). Atualmente as xilanases apresentam inúmeras aplicações e potencial biotecnológico para diversas indústrias e setores, como na produção de biocombustíveis, em cervejarias, bebidas, ração animal, e na agricultura (HOWARD, 2003).

No setor de bebidas, as xilanases podem ser utilizadas no processamento de frutas e vegetais, na fabricação de cerveja e na produção de vinho. Nesses casos, as xilanases, simultaneamente com pectinases e celulases, atuam na extração e clarificação de néctares, sucos e polpas, óleos (oliva, soja, milho) e vinhos (BIELY, 1985; COLLINS et al., 2005; BHAT, 2000). O uso dessas enzimas, na maceração de frutos e vegetais, permite a degradação mais específica dos sólidos presentes, aumentando o rendimento de extração e filtração do sumo e o desempenho do processo. A aplicação dessas enzimas aumenta a estabilidade do extrato e confere uma textura lisa ao suco; também preserva as vitaminas naturais e facilita a concentração do produto, diminuindo rapidamente a sua viscosidade. (GRASIN, FAUQUEMBERGUE, 1996; GALANTE et al., 1998; COLLINS et al., 2005). Uma grande variedade de preparações de enzimas é comercializada especificamente para melhorar a maceração, filtração, extração e qualidade de sucos e vinhos. A tecnologia de enzimas oferece enormes benefícios para a indústria de vinhos, mas novas enzimas, com propriedades melhores e mais específicas, devem surgir e fornecer benefícios adicionais para os produtores e consumidores de sucos e vinhos (GALANTE et al., 1998).

No setor alimentício, as xilanases também podem ser utilizadas para melhorar a qualidade da massa de pães, biscoitos, bolos e outros produtos de panificação (POUTANEN, 1997). As xilanases atuam hidrolisando as estruturas de arabinoxilanos presentes na massa do pão, o que facilita a redistribuição da água na massa. Isso melhora a elasticidade, a resistência e a textura da massa, aumentando o volume específico e a vida de prateleira do pão (HOWARD, 2003; AHMAD, 2009). Além disso, a adição de xilanases durante o processamento da massa de pão aumenta a concentração de arabino-xilo-oligossacarídeos,

substâncias com características benéficas para a saúde humana (WONG, SADDLER, 1992; HOWARD, 2003; COLLINS et al., 2005). A produção desses oligômeros de xilose ocorre pela adição das xilanases e enzimas do complexo xilanolítico sobre produtos ricos em xilano. Os oligossacarídeos produzidos são utilizados como aditivos para alimentos funcionais ou adoçantes alternativos (PULS, et al., 1988; de VRIES, VISSER, 2001).

Esses oligômeros de xilose, os chamados xilo-oligossacarídeos (XOS), podem ser aplicados como prebióticos, favorecendo o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e algumas estirpes de *Lactobacillus*, em alimentos lácteos e no cólon humano. As frações mais eficazes de XOS são aquelas que contêm cadeias curtas de xilose, com um grau de polimerização entre 2 e 5. Eles podem ser produzidos por processos químicos, mas o tratamento com enzimas específicas de hidrólise de xilano tem sido bastante estudado. A aplicação de enzimas xilanolíticas ocorre sobre a fração de xilano pura, separada do complexo lignocelulósico. As enzimas podem ser adicionadas, sobre material rico em xilano, diretamente, imobilizadas ou podem ser produzidas *in situ* por micro-organismos; posteriormente, os XOS produzidos são separados e purificados (DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012; MENEZES, DURRANT, 2008). Além dos efeitos sobre os micro-organismos colonizadores do tubo digestivo, os XOS controlam o nível de amônia no sangue, que pode ser produzido por microrganismos intestinais, quando ocorre excesso de ingestão de proteínas; podem, também, reduzir as complicações associadas à diabetes e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, sendo assim um agente preventivo contra o estresse oxidativo, anemias, arteriosclerose, aterosclerose, osteoporose e certos tipos de tumores. Os XOS podem ser aplicados em alimentos, bebidas carbonatadas e lácteas, isoladamente ou em combinação com outros prebióticos ou probióticos (MENEZES, DURRANT, 2008; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

A hidrólise enzimática do xilano também permite a produção de diversos produtos químicos utilizados na indústria alimentícia, como o xilitol. Este é um adoçante alternativo, que apresenta o mesmo poder adoçante da sacarose, porém com cerca de 60% do seu valor calórico. Este edulcorante tem sido utilizado em gomas de mascar, pastas de dentes (por ser um agente preventivo contra a cárie dentária) e produtos dietéticos (MUSSATTO, ROBERTO, 2002; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012). Ele pode ser produzido por hidrogenação catalítica da xilose ou por bioconversão da xilose em xilitol, utilizando enzimas ou microorganismos como agentes catalisadores. A xilose, utilizada nesse processo, pode ser obtida a partir de hidrolisados por xilanases, provenientes da fração hemicelulósica de

biomassa vegetal e materiais lenhosos (MUSSATTO, ROBERTO, 2002; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

Na alimentação animal, as xilanases auxiliam na degradação de determinados componentes cereais, e melhoram o valor nutricional do alimento. Também complementam a ação das enzimas digestivas próprias dos animais. As xilanases, juntamente com as  $\beta$ -glucanases, têm sido utilizadas em rações, que tem como base alimentos ricos em polissacarídeos não-amiláceos, como a cevada, que é rica em arabinoxilanos e  $\beta$ -glucanos (COWAN, 1996). As dietas baseadas em hemiceluloses apresentam pouca importância para organismos não-ruminantes, pois estes não tem as enzimas digestivas necessárias para a degradação desse material. Estas fibras, quando ingeridas, aumentam a viscosidade intestinal, interferindo na absorção dos nutrientes (KULKARNI et al., 1999). Assim, as xilanases, aplicadas em quantidades específicas, atuam na decomposição dos xilanos, melhorando sensivelmente a digestibilidade e absorção dos nutrientes da ração, aumentando o ganho de peso de frangos de corte e de porcos desmamados (COWAN, 1996; YIN et al., 2001; COLLINS et al., 2005). Enquanto a dieta de aves e suínos é baseada apenas em cereais, a dieta de ruminantes é mais complexa, pois, sendo provenientes de culturas forrageiras, é composta de celulose, hemicelulose, lignina e pectina. Preparações de enzimas que contem altos níveis de celulase, hemicelulase e pectinase têm sido utilizadas para melhorar a qualidade nutritiva de forragens (KUNG et al., 1997; GILBERT, 2010).

As xilanases podem ser aplicadas também na indústria de papel e celulose. Nesse setor, elas são aplicadas no processo de branqueamento da polpa de papel, atuando na hidrólise de xilano presentes na polpa (BAJPAI, 1999). Essa reação de clivagem permite a liberação da lignina e de compostos fenólicos, das fibras de celulose, com maior eficiência (KANTELINEN et al., 1993; SUURNAKKI et al., 1996; BHAT, 2000). Xilanases de diferentes organismos interagem de formas diferentes com os vários tipos de polpas (SOUNDARI, SASHI, 2009). A polpa de papel, resultante da polpação e branqueamento enzimático, apresenta-se com aspecto melhorado e com brilho aumentado (HOWARD et al., 2003). A utilização de xilanases no processo de polpação também reduz a utilização de métodos de polpação mecânica, reduzindo o consumo de energia de 30 a 38% (HOWARD et al., 2003; COLLINS et al., 2005).

A utilização dessas enzimas como agentes de pré-branqueamento, também confere vantagens ao meio ambiente. O branqueamento enzimático reduz o consumo de produtos químicos tóxicos, como o cloro elementar e dióxido de cloro, que, quando liberados, geram



grande poluição para o meio ambiente (SUURNAKKI et al., 1996; KULKARNI, 1999; COLLINS et al., 2005).

As xilanases também podem ser aplicadas na produção de etanol combustível, o chamado bioetanol de segunda geração. Nesse processo biológico, são necessárias três etapas para a produção de etanol a partir de material lignocelulósico, resíduos agrícolas e florestais (LEE, 1997; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012). Primeiramente, é necessário que ocorra a deslignificação dos materiais lignocelulósicos, para liberar a celulose e a hemicelulose do complexo com a lignina. Em seguida, deve ocorrer a despolimerização de diversos tipos de polissacarídeos (sacarificação), como celulose, amido, xilano, arabinogalactano, glucano, entre outros, para produzir açúcares livres, que, finalmente, são fermentados para produzir etanol (LEE, 1997; DODD, CANN, 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012). Assim, para que ocorra a hidrólise completa das fibras vegetais a monossacarídeos, é necessário o uso de xilanases juntamente com várias outras enzimas, tais como celulase, mananase, ligninase,  $\beta$ -xilosidase, glucanase,  $\beta$ -glucosidase, entre outras (OLSSON, HAHN-HAGERDAL, 1996; DODD, CANN, 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

Coquetéis enzimáticos para a degradação do material vegetal têm sido vastamente utilizados em pesquisas de produção de etanol de segunda geração. A escolha das enzimas e de suas quantidades apropriadas, para que atuem especificamente em resíduos de diferentes espécies vegetais, deve ser feita de acordo com os conhecimentos detalhados a respeito da composição relativa e da estrutura dos componentes da parede celular da espécie de planta em questão (DODD, CANN, 2010). A obtenção do etanol a partir de xilano ocorre com a fermentação da xilose. Mas, os numerosos micro-organismos, fermentadores naturais de xilose, geralmente não são bons produtores de etanol, e podem ser sensíveis a um ou mais produtos de fermentação (DODD, CANN, 2010). As pesquisas com engenharia genética, nos últimos anos, têm focado no desenvolvimento de linhagens com afinidade pela xilose e com maior produtividade. Micro-organismos capazes de produzir xilanases, para hidrolisar o xilano, e de fermentar a xilose, têm sido alvo dessas pesquisas, já que apresentam grande potencial de reduzir os custos de produção de etanol em biorefinarias (DODD, CANN, 2010; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

### 1.5 Fermentação submersa

A fermentação submersa é o cultivo de micro-organismos em um meio nutriente líquido. Enzimas podem ser produzidas utilizando este processo fermentativo, pois ele consiste no crescimento de micro-organismos exclusivamente selecionados (bactérias ou fungos) em recipientes estéreis, contendo um meio de cultura onde os micro-organismos produzem as enzimas de interesse a fim de decompor o material para sua nutrição (RENGE et al., 2012).

A escolha do substrato adequado para a produção de xilanases é muito importante. O substrato atua como fonte de carbono e energia, e também proporciona os compostos indutores necessários para o organismo produzir essas enzimas (HALTRICH et al., 1996). É preciso que o micro-organismo se mantenha por um período de tempo prolongado em contato com o substrato indutor, uma vez que, uma fase de produção prolongada pode resultar num aumento da produtividade geral do processo de fermentação (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999). Substratos hemicelulósicos mais baratos, como sabugo de milho, farelo de trigo, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de milho tem sido bastante utilizados para a produção de xilanases (KULKARNI et al., 1999).

Meios típicos para a produção de xilanases fúngicas contém, em adição ao substrato indutor, vários sais minerais e alguns íons metálicos (HALTRICH et al., 1996)

As enzimas extracelulares são secretadas pelos micro-organismos para o meio de fermentação; para a remoção das enzimas do meio, é necessário, primeiramente, que sejam removidos os produtos insolúveis, como as células microbianas. As enzimas no meio restante são então concentradas por filtração em membrana ou evaporação, de acordo com a aplicação pretendida. Se preparações de enzimas puras são necessárias, estas geralmente são separadas por cromatografia (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999; RENGE et al., 2012).

Em uma fermentação submersa para produção de enzimas alguns parâmetros devem ser controlados para otimizar o processo de fermentação como temperatura, pH, teor de oxigênio e formação de dióxido de carbono (RENGE et al., 2012). Este método de produção de enzimas apresenta algumas desvantagens: os custos são mais elevados, devido a complexidade dos meios de cultura; grandes reatores são necessários; há também maior risco de contaminação, em comparação fermentação sólida, devido a maior disponibilidade de água. Entretanto, o processo de fermentação submersa apresenta diversas vantagens, pois a medida de parâmetros do processo (temperatura, pH, aeração) é mais fácil do que com a fermentação em estado sólido e as células microbianas são uniformemente distribuídas por

todo o meio, aproveitando todos os nutrientes disponíveis (KULKARNI et al., 1999; RENGE et al., 2012).

### **1.6 Resíduos agroindustriais**

Os resíduos agroindustriais têm causado sérios problemas de poluição. Esse material, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. O acúmulo desse material, que apresenta grande concentração de matéria orgânica, pode causar impactos negativos sobre a qualidade do solo e da água ao redor, interferindo no equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos da região (AQUARONE et al., 1990; YEVICH, LOGAN, 2003).

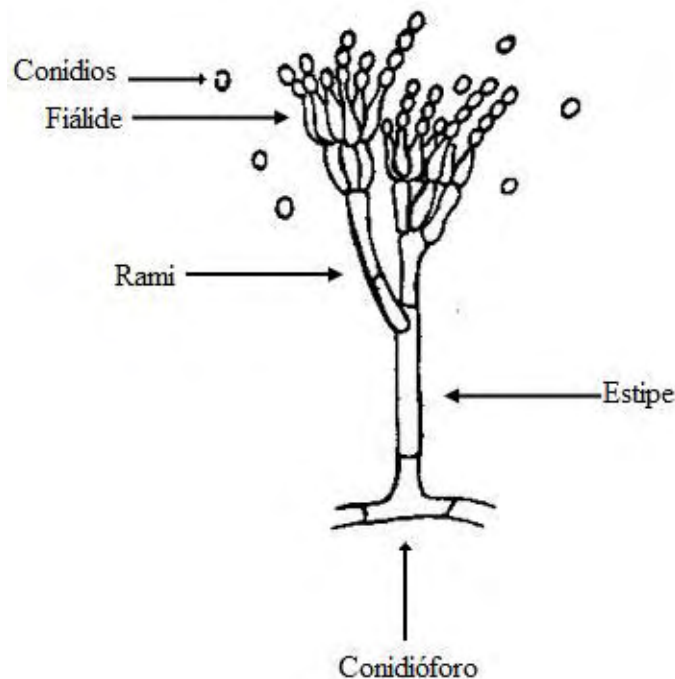
Como no Brasil existe um grande número de indústrias agrícolas, a quantidade de resíduos apresenta elevado excedente. Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são geradas anualmente, através de práticas florestais e agrícolas, indústrias de papel celulose, indústrias de madeira, resíduos de indústrias de fibras têxteis, resíduos de cereais, e ainda resíduos sólidos urbanos, que representam um grande problema de poluição ambiental (PRADE, 1995; GÍRIO et al., 2010). Estas fontes, abundantes e de baixo custo, podem ser convertidas em produtos comerciais de alto valor agregado, por conter muitas substâncias de elevado valor biológico, ou serem utilizadas como substrato e matéria prima para processos secundários, na obtenção de outros produtos, como as enzimas (PRADE, 1995; LAUFENBERG, et al., 2003; DEUTCHSMANN, DEKKER, 2012).

As xilanases atuam no tratamento e reciclagem desses resíduos, para produção de combustíveis renováveis, produtos fermentados, rações animais e química fina (PRADE, 1995; COLLINS, et al., 2005). Quantidades consideráveis de xilano estão presentes em materiais provenientes de resíduos agrícolas e agroindustriais, como palha de arroz, de trigo, de milho, bagaço de cana-de-açúcar e serragem de madeira, o que permite a utilização desses materiais para produção de xilanases (BIELY 1985; PRADE, 1995; DEUTSCHMANN, DEKKER, 2012).

### 1.7 O gênero *Penicillium* e a espécie *Penicillium chrysogenum*

O gênero *Penicillium* pode ser encontrado nos mais diferentes tipos de ambientes. Algumas espécies estão presentes no solo, enquanto outras preferem vegetação em decomposição, habitats mais secos, sementes, ou madeira em decomposição (PITT, 1988).

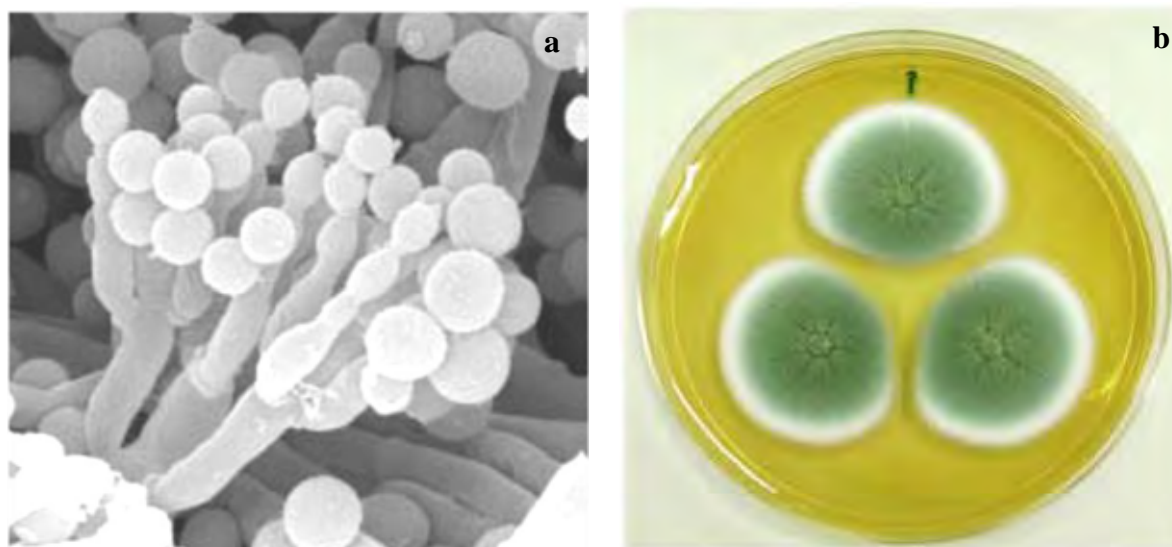
Pertencente ao filo Ascomycota, classe dos Euascomycetes, ordem Eurotiales, da família Trichomaceae, *Penicillium* é um gênero de Hyphomycetos, caracterizado pela produção de conídios em cadeias a partir dos verticilos das fiálides. A estrutura de frutificação dos conídios (conidióforo) em *Penicillium* é denominada *penicillus*, e a classificação do subgênero é determinada pelo tipo de *penicillus*. Os conídios são produzidos em cadeias na extremidade superior dos conjuntos de fiálides (Figura 4); as fiálides partem dos verticilos nas hastes das hifas, ou estipes, seja diretamente ou com a intervenção de células de apoio especializadas - rami, râmulis e métulas (PITT, 1988; PONTÓN et al., 2002).



**Figura 4:** Representação de conidióforo típico do gênero *Penicillium* (adaptado de MENÉNDEZ, 2004).

Do latim *penicillus* (pincel) e do grego *chrysós* (dourado, amarelo) *genos* (linhagem, origem), a espécie *Penicillium chrysogenum*, também é conhecida como *Penicillium notatum* ou *Penicillium meleagrinum* (PITT, 1988). Os conidióforos (Figura 5a) são terverticilados, ou seja, apresentam três pontos de ramificação entre a fiálide e a estipe (PITT, 1988). *Penicillium chrysogenum* apresenta micélio branco a amarelado. As colônias podem apresentar em sua superfície, gotículas de um exsudato; este pode ser de amarelo claro a amarelo brilhante ou castanho amarelado, devido a presença de um pigmento amarelo brilhante, solúvel, que é geralmente produzido. A 25 °C as colônias apresentam crescimento rápido, e são de aparência aveludada em verde com uma coroa branca ao redor (Figura 5b); a 37 °C não há crescimento, ou crescem muito pouco (PITT, 1988; PONTÓN et al., 2002).

*Penicillium chrysogenum* é um fungo ubíquo, ocupando um grande número de habitats em solos, vegetação em decomposição e alimentos. Sua distribuição é universal, estando presente em todas as regiões biologicamente acessíveis e em diferentes climas (PITT, 1988; PONTÓN et al., 2002).



**Figura 5:** a- Conidióforo de *Penicillium chrysogenum*. Microscopia eletrônica de varredura, 3.610X. (PONTÓN et al., 2002). b- Colônias de *Penicillium chrysogenum* crescidas em meio MEA a 25 °C, por 7 dias.

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando-se o gênero *Penicillium* para a produção de xilanases. Belancic et al. (1995) identificaram duas xilanases produzidas por *Penicillium purpurogenum*, com propriedades distintas entre elas, e em seu trabalho, destacaram a produção de xilanases por outras espécies, como *Penicillium janthinellum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium herquei* e *Penicillium capsulatum*.

Knob e Carmona (2008) cultivaram uma linhagem de *Penicillium sclerotiorum* para produção de xilanases. Foram avaliados diversos substratos para a produção, como, xilano de aveia, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de aveia, palha de arroz, farinha de soja, sabugo de milho, e bagaço de laranja. A maior produção de xilanase em cultivo submerso foi observado em meio contendo xilano de aveia, seguido por farelo de trigo. As melhores condições de cultivo submerso dessa linhagem para produção dessa enzima em meio líquido de Vogel foram 1% de xilano de aveia, 5 dias de cultivo, pH inicial de 6,5 e temperatura de 25 °C em condição estacionária.

Terrasan et al. (2010) verificaram a influência dos mesmos parâmetros sobre a produção de xilanase por uma linhagem de *Penicillium janczewskii*, e detectaram maior atividade em cultivos com farelo de aveia e bagaço de cevada. A maior produção em meio líquido de Vogel foi obtida com o bagaço de cevada a 2% em cultivos estacionários de 7 dias, pH 6,0 a 25 °C.

Outras linhagens de *Penicillium chrysogenum* já foram utilizadas para a produção de xilanases. Haas et al. (1992) cultivaram uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* em meio contendo xilano de aveia como fonte de carbono e indutor da produção de xilanase.

Medeiros (2007) obteve maior produção de xilanase quando cultivou uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* em palha de cana-de-açúcar e fibra de coco, com valores próximos aos obtidos em cultivo com xilano de aveia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi verificar a produção de xilanases por *Penicillium chrysogenum* em fermentação submersa e purificar a principal xilanase produzida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Comparar a eficiência de diferentes resíduos agroindustriais na indução de xilanases por esse fungo e estabelecer as melhores condições de produção dessas enzimas, utilizando o resíduo mais promissor.
- b) Verificar a influência de fatores químicos e físicos, como agitação, cinética, pH e temperatura, sobre a produção de xilanases, assim como sobre o crescimento da linhagem de *Penicillium chrysogenum*.
- c) Purificar a xilanase secretada por *Penicillium chrysogenum* quando cultivado nas melhores condições estabelecidas.
- d) Caracterizar bioquimicamente o extrato de cultura bruto e a xilanase purificada quanto aos seguintes parâmetros: pH e temperatura ótimos de reação; estabilidade ao pH e a temperatura; efeito de íons e substâncias sobre a atividade xilanase; e estimar a massa molar da enzima purificada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagem, cultivo e manutenção

A linhagem de *Penicillium chrysogenum* utilizada neste trabalho foi isolada de solo de cerrado sob caatinga, da Floresta Nacional Contendas do Sincorá na Bahia (SIMÕES, 2006) e pertence à coleção de cultura do Centro de Estudos Ambientais – CEA/UNESP Campus de Rio Claro - SP. Essa linhagem foi mantida em meio sólido de Vogel (1956), contendo farelo de trigo como fonte de carbono, na concentração de 1,5 % (m/v) e 1,5 % de ágar (m/v). Foram realizados repiques periódicos em tubos de ensaio, sendo as culturas incubadas por 7 dias a 28 °C. Após esse período a linhagem foi armazenada a 4 °C.

O meio de cultura sólido para produção de esporos foi preparado com a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada (v/v) suplementada com farelo de trigo na concentração de 3,0 % (m/v) e ágar 1,5 % (m/v). O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavados (20 min, 120 °C, 1 atm) e inclinados.

O meio líquido de Vogel foi preparado utilizando-se a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes, acrescido de 1% (m/v) da fonte de carbono específica para cada experimento, conforme descrito posteriormente.

Suspensões de conídios da linhagem de *P. chrysogenum* foram preparadas com água destilada esterilizada, em concentrações de 2 a 5 x 10<sup>7</sup> esporos/mL. Um volume de 1,0 mL dessa suspensão foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido.

#### 3.2 Obtenção do filtrado de cultura e extração do conteúdo intracelular

Após o crescimento pelo período adequado a cada experimento, o micélio foi separado por filtração a vácuo e o filtrado de cultura bruto, foi utilizado como fonte de proteínas extracelulares.

O micélio úmido congelado foi triturado com 3 partes de areia lavada (m/m). A seguir, foram adicionadas 15 partes (v/m) de tampão acetato de sódio pH 5,0, para uma parte



de micélio. A mistura foi centrifugada a 3900g, por 20 min., a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de proteínas intracelulares.

### 3.3 Determinação da atividade xilanase

A atividade xilanase foi determinada pelo método proposto por Bailey et al. (1992) modificado como segue. O filtrado de cultura (10 a 250µL) foi incubado com 750 µL de uma suspensão de xilano de vidoeiro ou bétula (birchwood xylan) 1% (m/v) em tampão acetato de sódio pH 5,0, 0,05 mol/L, de modo a completar o volume a 1250 µL. O tubo de reação foi mantido em banho-maria a 50 °C. Em intervalos de tempo adequados, alíquotas de 250 µL foram retiradas e adicionadas a 250 µL do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) para a determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959), utilizando-se xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

A atividade enzimática foi expressa em unidades por volume (U/mL) do filtrado de cultura e a atividade específica em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína) presente nesse filtrado.

### 3.4 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão. Todas as dosagens foram realizadas em duplicata, utilizando-se brancos apropriados.

### 3.5 Produção de xilanase por *Penicillium chrysogenum* por fermentação submersa

#### 3.5.1 Influência do substrato sobre a produção de xilanase

Para a determinação do substrato mais apropriado para a produção de xilanase, a linhagem de *P. chrysogenum* foi cultivada em condição estática a 28 °C, por 7 dias, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido de Vogel, pH 6,5, contendo 1 % (m/v) de cada um dos substratos relacionados, como única fonte de carbono. Como

substrato foram utilizados carboidratos puros como glicose, xilose, Avicel, carboximetilcelulose (CMC) e xilano de aveia, e também, carboidratos naturais como farelo de aveia e farelo de trigo, e alguns resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cevada, casca de laranja e sabugo de milho. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido por um produtor local, o bagaço de cevada pela cervejaria Baumgartner (Ipeúna – SP) e a casca de laranja e o sabugo de milho foram recolhidos de resíduos domésticos. Os resíduos foram triturados, lavados exaustivamente e secos em estufa a 50 °C por 3 dias. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

### 3.5.2 Influência da granulometria do substrato sobre a produção de xilanase.

Os resíduos que induziram maior produção de xilanases foram selecionados para testes granulométricos. O bagaço de cana-de-açúcar e o bagaço de cevada, triturados, foram classificados em peneiras de acordo com as granulometrias especificadas na Tabela 1, sendo então utilizados como única fonte de carbono nos cultivos subsequentes.

**Tabela 1:** Faixas de granulometria dos substratos utilizados

Granulometria	Tyler (Mesh)	Abertura (mm)
I	> 10	> 2
II	10 - 18	2 - 1
III	18 - 45	1 - 0,35

### 3.5.3 Cinética de produção de xilanase

O crescimento e a produção de xilanase por *P. chrysogenum* foram avaliados por 15 dias em cultivo estático e por 9 dias em cultivo agitado a 120 rpm. Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel, suplementado com 1% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar II, pH 6,5 a 28 °C. O crescimento foi determinado indiretamente pela quantificação do teor proteico intracelular.

### **3.5.4 Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de xilanase**

Para a determinação da influência do pH do meio, na produção de xilanase, foram realizados cultivos estáticos em meio líquido de Vogel contendo 1 % (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar II, a 28 °C, por 8 dias. Os meios de cultura tiveram seus pHs ajustados com soluções de hidróxido de sódio (1 mol/L) ou ácido clorídrico (1 mol/L) para valores de pH entre 3,0 e 9,5, com variação de 0,5 unidade.

### **3.5.5 Influência da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanase**

Para o estabelecimento da temperatura mais apropriada para a produção de xilanases, a linhagem foi cultivada em meio líquido de Vogel contendo 1% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar II, pH 5,0, por 8 dias sob condição estática. Os cultivos foram realizados em temperaturas entre 15 e 40 °C, com intervalos de 5 °C.

## **3.6 Purificação da xilanase produzida por *Penicillium chrysogenum***

### **3.6.1 Ensaio do teste em tubo para a seleção do trocador iônico e do pH**

A melhor condição de ligação da enzima à uma resina de troca iônica e sua recuperação foram determinadas por um teste em tubo de ensaio, adicionando-se o filtrado enzimático bruto a resina aniônica DEAE Sephadex A-50, e a catiônica CM Sephadex C-50. Para a resina aniônica foram utilizados: tampão piridina 0,05 mol/L pH 5,0, imidazol 0,05 mol/L pH 6,0 e Tris HCl 0,05 mol/L pHs de 7,0 a 9; para a catiônica foram utilizados tampões: acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,0 a 5,0, citrato de sódio 0,05 mol/L pH 6,0 e fosfato de sódio 0,05 mol/L nos pHs de 7,0 a 8,0. A liberação da enzima foi realizada com 0,5 mol/L de NaCl no mesmo tampão, sendo determinadas as atividades enzimáticas no sobrenadante e no tampão usado para lavagem de resina, antes e depois da adição do sal.

### 3.6.2 Cromatografia de troca iônica

O filtrado enzimático bruto, contendo a xilanase, foi dialisado contra tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5 e aplicado em coluna de troca iônica contendo CM Sephadex C-50 (17 x 2,2 cm), equilibrada no mesmo tampão. O fluxo da coluna foi ajustado para 60 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. A eluição foi realizada com gradiente de NaCl de 0 a 0,7 mol/L. As proteínas presentes nas frações coletadas foram detectadas pela leitura da absorbância a 280 nm e a atividade xilanase foi determinada nas frações eluídas. Foram reunidas as frações correspondentes aos picos de atividade xilanase.

### 3.6.3 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra proveniente da cromatografia de troca iônica foi dialisada para remoção do NaCl, liofilizada, dissolvida em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5, e aplicada em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-100 (64 x 2,6 cm), equilibrada na mesma solução tampão. O fluxo da coluna foi ajustado para 20 mL/h, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm para detecção de proteínas e determinada a atividade xilanase das frações obtidas. Foram determinados os volumes das frações para se estimar o volume de eluição da xilanase e sua massa molar, em relação aos padrões utilizados na calibração da coluna (fosforilase B 97 kDa, soroalbumina bovina 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor de tripsina 20,1 kDa, lactalbumina 14,4 kDa).

Em todas as etapas do processo de purificação foram adicionados, à solução enzimática, 10% (v/v) de glicerol e 1 mmol/L de DTT.

### 3.7 Eletroforese em condição denaturante

As frações reunidas da cromatografia de exclusão molecular foram avaliadas quanto ao seu grau de pureza, por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio - PAGE-SDS (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado gel gradiente com variação da concentração de poliacrilamida de 8 a 18% (m/v). As amostras foram preparadas na proporção 1:1 em tampão de amostra (glicerol 17,5% (v/v), SDS 4% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v) e Tris-HCl 0,025 Mol/L, pH 6,8), na presença de 10% (m/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas por 5 minutos em água fervente. A eletroforese foi realizada em

tampão Tris 0,025 Mol/L glicina-NaOH 0,19 Mol/L pH 8,3 com SDS 0,1% (m/v), sob corrente de 100 V. Após a corrida o gel foi corado com coomassie brilliant blue R-250 0,1% (m/v) em etanol: ácido acético: água (3:1:6 v/v/v). Após período apropriado, o gel foi descorado com a mesma solução sem o corante.

### **3.8 Caracterização da xilanase bruta e purificada**

#### **3.8.1 Influência do pH sobre a atividade xilanase**

O pH ótimo de atividade foi determinado incubando-se a amostra da enzima bruta e purificada, com o substrato em tampões com diferentes valores de pH, variando de 2,0 a 10,0, com intervalos de 0,5 unidade. Os tampões utilizados foram: glicina HCl (2,0 a 3,5), acetato de sódio (4,0 a 5,5), imidazol (6,0 a 7,0), Tris HCl (7,0 a 9,0) e glicina NaOH (9,0 a 10,0).

#### **3.8.2 Influência da temperatura sobre a atividade xilanase**

A enzima bruta e a purificada foram incubadas com substrato em tampão imidazol 0,05 mol/L pH 6,0, para a enzima bruta, e pH 6,5 para a enzima purificada, em banho-maria com temperaturas de 20 a 75 °C, com intervalos de 5 °C, para determinação da temperatura ótima de atividade da xilanase.

#### **3.8.3 Estabilidade térmica da atividade xilanase**

Para determinar a estabilidade térmica da xilanase, a enzima bruta e a purificada foram incubadas a 40, 45, 50, 55 e 60 °C por 60 minutos na ausência de substrato. Em intervalos de tempo apropriados foram retiradas alíquotas dessas amostras, as quais foram mantidas em banho de gelo para subsequente dosagem da atividade xilanase em tampão imidazol 0,05 mol/L, pH 6,0, para o filtrado bruto, e pH 6,5 para a enzima purificada, a 45 °C. Nessas temperaturas, foram estimados as meias vidas a partir do gráfico de atividade residual contra o tempo de incubação.

### **3.8.4 Estabilidade da atividade xilanase em diferentes pHs**

Para determinação da estabilidade ao pH, as amostras foram incubadas por 24 horas a 4 °C na ausência de substrato em tampões com valores de pH variando de 2,0 a 10,0, sendo utilizados os mesmos tampões citados no item 3.8.1. Após o período de incubação, foi determinada a atividade xilanase residual. A dosagem da atividade xilanase foi realizada em tampão imidazol 0,05 mol/L, pH 6,0, para a enzima bruta, e pH 6,5 para a enzima purificada, a 45 °C.

### **3.8.5 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre a atividade xilanase**

O efeito de determinadas substâncias e íons metálicos sobre a atividade xilanase foi avaliado pela incubação do filtrado enzimático bruto e da enzima purificada, com substrato em tampão imidazol 0,05 mol/L pH 6,0, para o filtrado bruto, e pH 6,5 para a enzima purificada, na presença das seguintes substâncias: NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, BaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, acetato de chumbo, acetato de amônio, citrato de sódio, glicerol, sulfato de amônio, SDS (dodecil sulfato de sódio), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), DTT (1,4-ditio-D-treitol) e β-mercaptoetanol, todos nas concentrações de 2 e 10 mmol/L.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Produção de xilanase por *Penicillium chrysogenum*

#### 4.1.1 Influência do substrato

Em estudos anteriores de seleção de cepas produtoras de xilanases (SIMÕES, 2006) a linhagem de *Penicillium chrysogenum* utilizada se apresentou como boa produtora desta enzima, quando cultivada em meio com xilano de aveia. No presente trabalho, diferentes fontes de carbono foram avaliadas quanto à influência sobre a produção de xilanases extracelulares e sobre o crescimento desta linhagem fúngicas, medido indiretamente pelo teor de proteína intracelular. A escolha de um substrato apropriado é muito importante para a produção de xilanases, pois este além de ser fonte de carbono e energia, fornece compostos necessários para a indução da produção dessas enzimas.

Como se pode observar na Tabela 2, dentre os cultivos com substratos puros, a maior produção foi observada nos cultivos com xilose, sendo observada menor atividade com xilano de aveia e glicose. Nas condições do ensaio, a xilose mostrou-se melhor indutora dessa atividade que o xilano. A atividade em meio com xilose foi de 3,59 U/mL, cerca de 25 vezes maior que em cultivo com glicose (0,15 U/mL), sugerindo que a enzima é induzível, podendo também sofrer repressão catabólica pela glicose. Nos cultivos com farelo de aveia, houve a maior produção de xilanase com valor médio de 4,56 U/mL, enquanto que em farelo de trigo a atividade foi de 1,63 U/mL. Nos cultivos com bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cevada e sabugo de milho, as atividades apresentaram valores próximos daqueles observados nos cultivos com xilose. Esse resultado é importante já que a produção de xilanases em resíduos agroindustriais contribui para a redução do custo de produção dessas enzimas, podendo viabilizar um processo em maior escala.

Dentre os resíduos agroindustriais, o cultivo com bagaço de cana-de-açúcar se destacou por apresentar a maior atividade específica com valor de 8,75 U/mg de proteína, fator interessante para o uso desse substrato para produção seguida de purificação das xilanases. O cultivo com xilose apresentou o segundo maior valor de atividade específica (6,59 U/mg de proteína) seguido pelo observado em meio com sabugo de milho (6,11 U/mg

de proteína). Os cultivos com os demais substratos apresentaram valores inferiores de atividade específica. Nos cultivos contendo Avicel e carboximetilcelulose a atividade xilanase não foi detectada.

A cepa de *P. chrysogenum* apresentou o maior crescimento em cultivo com xilose (2,57 mg de proteína), seguido pelo verificado em meio com sabugo de milho, com 2,37 mg de proteína, e por bagaço de cevada, com valor de 1,87 mg de proteína, em 7 dias de cultivo.

Além dessas análises, também foram realizados ensaios para determinação quantitativa da atividade xilanase intracelular, mas em nenhum cultivo foi possível detectar esta atividade enzimática.

**Tabela 2:** Influência de diferentes carboidratos puros, naturais e resíduos agroindustriais sobre produção de xilanase por *Penicillium chrysogenum*.

Fonte de carbono 1% (m/v)	Proteína intracelular (mg)	Proteína extracelular (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína extracelular)
Avicel	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,00	ND	ND
CMC	0,34 ± 0,06	0,02 ± 0,01	ND	ND
Glicose	1,42 ± 0,17	0,34 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,44 ± 0,01
Xilano de aveia	0,25 ± 0,12	0,64 ± 0,12	0,47 ± 0,13	0,73 ± 0,14
Xilose	2,57 ± 0,07	0,54 ± 0,03	3,59 ± 0,90	6,59 ± 1,22
Farelo de aveia	1,47 ± 0,12	0,92 ± 0,05	4,56 ± 0,19	4,96 ± 0,48
Farelo de trigo	2,37 ± 0,14	0,74 ± 0,06	1,63 ± 0,24	2,21 ± 0,18
Bagaço de cana- de-açúcar	1,12 ± 0,16	0,38 ± 0,02	3,33 ± 0,34	8,75 ± 1,10
Bagaço de cevada	1,87 ± 0,38	0,59 ± 0,01	2,28 ± 0,06	3,83 ± 0,04
Casca de laranja	1,62 ± 0,16	1,99 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,12 ± 0,02
Sabugo de milho	1,26 ± 0,01	0,45 ± 0,05	2,74 ± 0,53	6,11 ± 2,43

Média e desvio padrão entre triplicatas. Cultivos estáticos em meio de Vogel, pH 6,5, suplementado com 1% da fonte de carbono (m/v), por 7 dias, a 28 °C. ND: não detectado.

O cultivo de fungos filamentosos, em substratos naturais e resíduos agroindustriais para produção de xilanases, têm sido bastante estudados: Oliveira et al. (2006) avaliaram a produção de xilanases por *Penicillium janthinellum*, obtendo maior produção em cultivos contendo sabugo e palha de milho; *Apergillus versicolor* apresentou maior produção de xilanase em cultivo com farelo de trigo (CARMONA et al., 1997); *Aspergillus giganteus* em



bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho (COELHO, CARMONA, 2003); e *Penicillium janczewskii* em farelo de trigo, farelo de aveia e bagaço de cevada (TERRASAN et al., 2010).

Os substratos selecionados para as próximas etapas foram o bagaço de cana-de-açúcar e o bagaço de cevada, pois, dentre os resíduos agroindustriais, apresentaram maior produção de xilanases, juntamente com o sabugo de milho. Apesar do cultivo nesse substrato apresentar atividade próxima daquela observada com os resíduos selecionados, os resultados obtidos com esse resíduo apresentaram grande variação entre as médias das repetições.

#### 4.1.2 Influência da composição granulométrica do substrato

A composição dos substratos complexos é importante para o crescimento microbiano e para o rendimento de xilanases em um processo fermentativo, pois influencia na acessibilidade do micro-organismo aos nutrientes, na disposição e aderência das hifas ao substrato, na expressão dos níveis de xilanase e na liberação de metabólitos para o meio extracelular (KULKARNI, 1999). Além disso, utilizando-se a separação do substrato pela granulometria é possível homogeneizar o material, que, sendo proveniente da agroindústria, apresenta-se extremamente heterogêneo (RAGHAVENDRA et al. 2004).

A influência da granulometria dos resíduos selecionados sobre a produção da enzima, bem como os valores de proteína intracelular obtidos, podem ser visualizados na Tabela 3. Pode-se observar que a granulometria influenciou a produção de xilanases, nos experimentos com o bagaço de cana-de-açúcar, interferindo também no crescimento micelial, mas pouco afetou a produção de enzima e o crescimento do fungo nos ensaios com bagaço de cevada.

A maior atividade enzimática foi verificada com o bagaço de cana-de-açúcar II, com tamanho entre 2 e 1 mm, obtendo-se produção de 4,23 U/mL. Os demais tratamentos, com o bagaço de cana-de-açúcar, maiores que 2 mm e entre 1 e 0,35 mm, apresentaram atividades menores com valores de 1,79 e 2,85 U/mL, respectivamente. Nos cultivos com bagaço de cevada houve uma produção semelhante aquela verificada com bagaço de cana-de-açúcar III, sendo os valores de atividade semelhantes entre os três tamanhos avaliados.

Diversos trabalhos relativos à influência da granulometria sobre a produção de enzimas e crescimento microbiano têm sido relatados. Coelho et al. (2001) verificaram a influência da composição granulométrica da casca de coco verde sobre a produção de xilanases, carboximetilcelulases, proteases e poligalacturonases por *Aspergillus niger*. Como resultado, encontraram que a granulometria influenciou a produção de proteases e xilanases,

sendo que a maior produção de xilanases ocorreu com fibras de coco de tamanho igual ou inferior a 1,19 mm.

**Tabela 3:** Influência da composição granulométrica de resíduos agroindustriais na produção de xilanases por *Penicillium chrysogenum*.

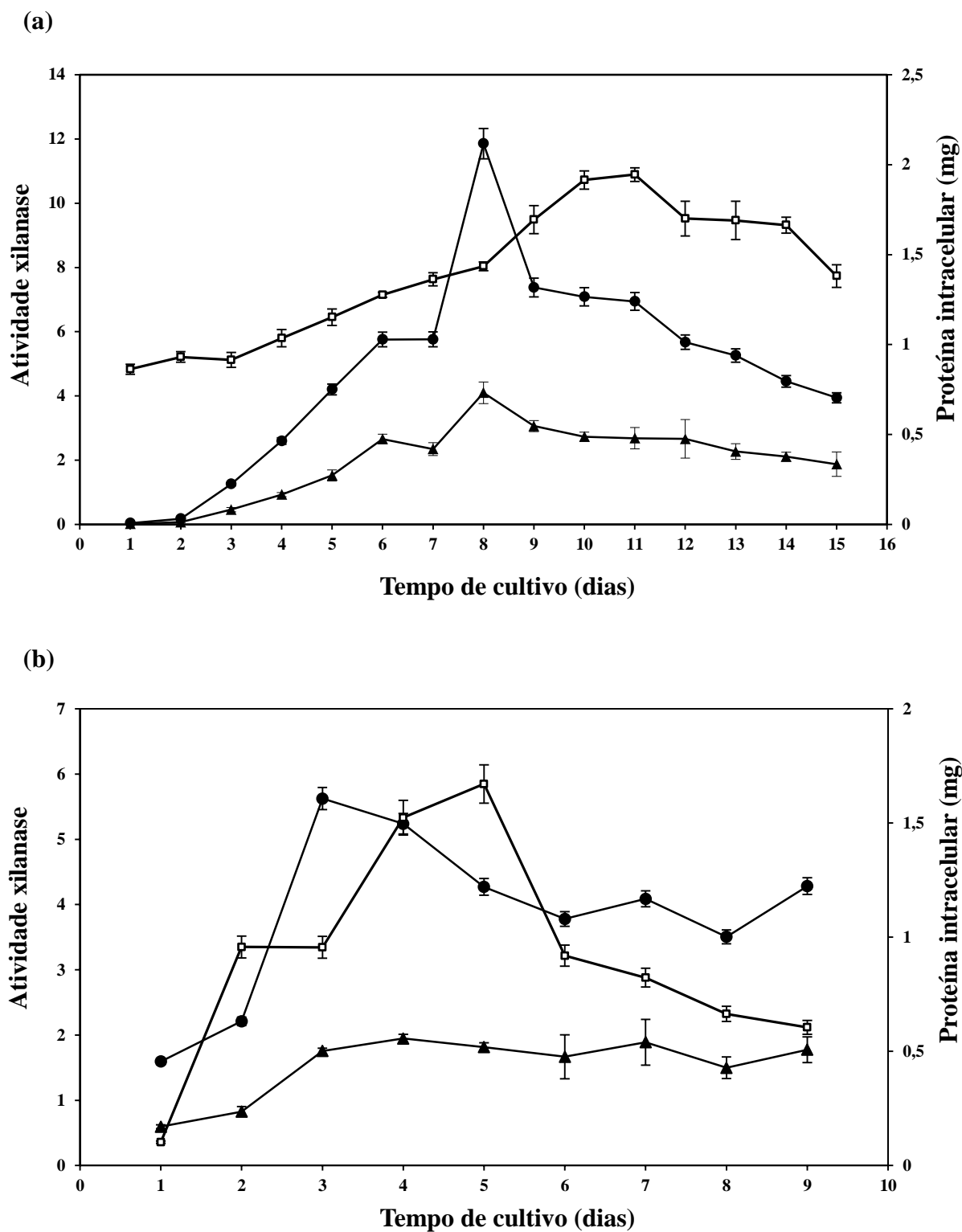
Fonte de carbono 1% (m/v)	Proteína intracelular (mg)	Proteína extracelular (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína extracelular)
Bagaço de cana-de-açúcar I	0,53 ± 0,02	0,26 ± 0,01	1,79 ± 0,06	6,89 ± 0,27
Bagaço de cana-de-açúcar II	0,85 ± 0,20	0,42 ± 0,05	4,23 ± 0,27	9,99 ± 0,19
Bagaço de cana-de-açúcar III	0,27 ± 0,01	0,34 ± 0,04	2,85 ± 0,26	8,37 ± 0,21
Bagaço de cevada I	1,44 ± 0,05	0,36 ± 0,04	2,69 ± 0,39	7,45 ± 0,15
Bagaço de cevada II	1,27 ± 0,13	0,36 ± 0,06	2,99 ± 0,22	8,21 ± 0,13
Bagaço de cevada III	1,08 ± 0,17	0,37 ± 0,01	2,47 ± 0,24	6,65 ± 0,29

Média e desvio padrão entre triplicatas. Cultivos estáticos em meio de Vogel, pH 6,5 suplementado com 1% da fonte de carbono (m/v), por 7 dias, a 28 °C.

#### 4.1.3 Cinética de produção de xilanase

A melhor condição para a produção da xilanase também foi avaliada pelo estudo cinético da fermentação submersa em cultivo estático e em cultivo agitado a 120 rpm. Para isso, foram avaliados o crescimento e a atividade xilanase em cultivos nessas condições e os resultados podem ser visualizados na Figura 6.

O cultivo estático foi realizado por 15 dias, sendo retiradas amostras a cada 24 horas (Figura 6a). A linhagem de *P. chrysogenum* atingiu o maior crescimento com 11 dias de cultivo, correspondendo a 1,94 mg de proteína. A maior produção de xilanase ocorreu no 8º dia de cultivo, apresentando o valor de 4,10 U/mL, e atividade específica de 11,86 U/mg de proteína. A maior produção de xilanases, nesse caso, ocorreu no final da fase exponencial de crescimento do fungo. Segundo Kulkarni et al. (1999) as xilanases são geralmente expressas ao final da fase exponencial e o tempo de cultivo varia de acordo com o meio de cultura utilizado.



**Figura 6:** Produção de xilanase por *Penicillium chrysogenum* em cultivo estático (a) e agitado a 120 rpm (b). Cultivo em meio de Vogel, pH 6,5, suplementado com 1% de bagaço de cana-de-açúcar II (m/v), a 28 °C. (▲) atividade xilanase (U/mL), (●) atividade específica de xilanase (U/mg proteína extra.), (□) proteína intracelular (mg).

O cultivo agitado foi realizado durante 9 dias (Figura 6b) porque, em meio agitado, a maior superfície de contato entre o micro-organismo e o meio de cultivo, melhora a mistura dos componentes do meio e a distribuição dos nutrientes, o que acelera o crescimento e a produção de enzimas e outros metabólitos. Nessas condições, o maior crescimento ocorreu com 5 dias de cultivo, correspondendo a um teor protéico intracelular de 1,67 mg. A atividade xilanásica atingiu um valor máximo de 1,95 U/mL no 4º dia de cultivo e a atividade específica foi maior no 3º dia de cultivo com valor de 5,62 U/mg de proteína.

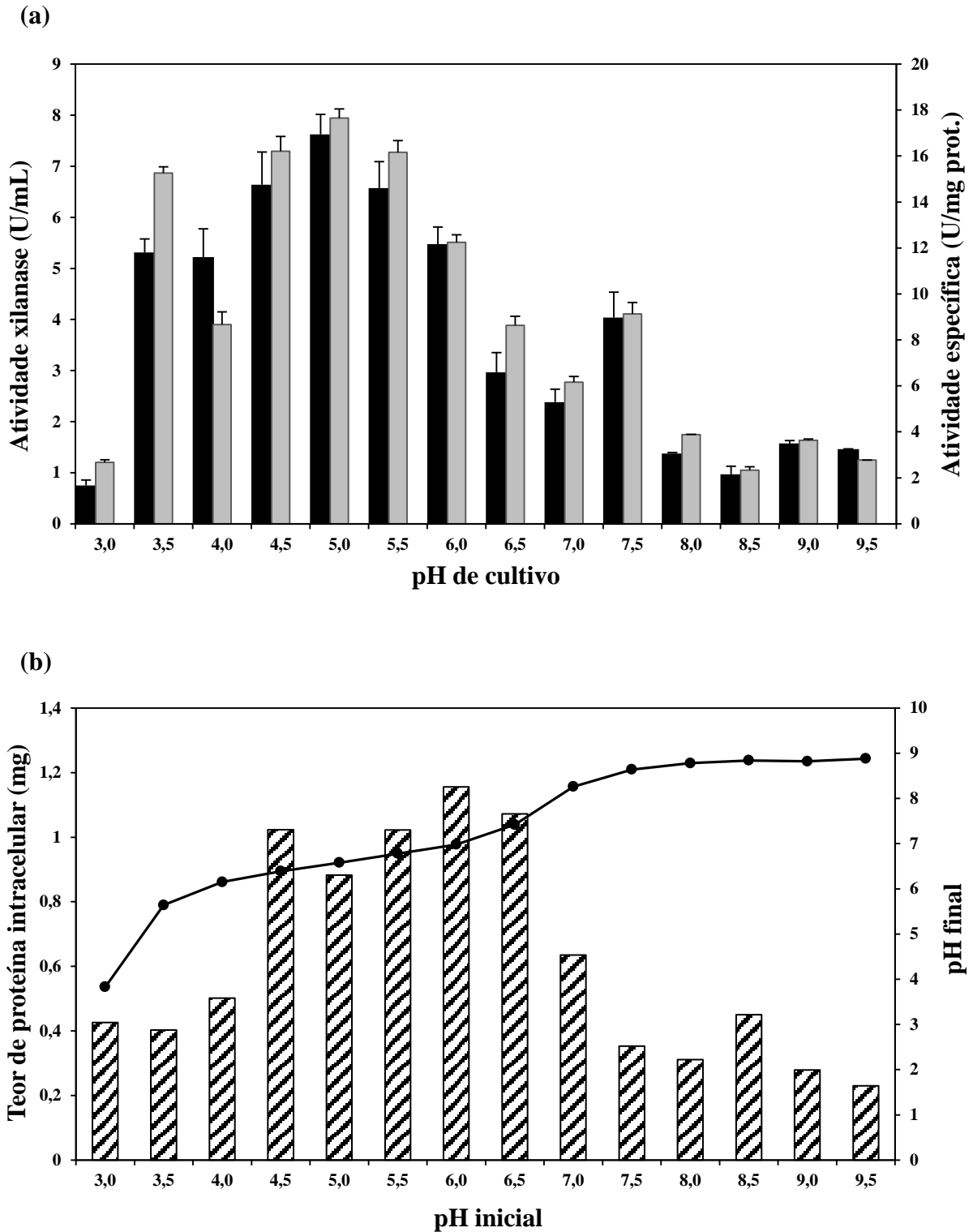
Em estudos cinéticos semelhantes, Ahmed et al. (2007) realizaram o cultivo de *Trichoderma harzianum* em meio de Vogel contendo xilano de bétula (birchwood) como fonte de carbono e obtiveram pico de produção de 6,30 U/mL no 5º dia de cultivo. Carmona et al. (1998) cultivaram *Aspergillus versicolor* de forma estática em meio contendo farelo de trigo e verificaram maior produção também no 5º dia de cultivo. Knob e Carmona (2008), cultivando *Penicillium sclerotiorum* em meio com xilano de aveia, observaram maior produção de xilanases no 8º dia em cultivo estático (27,21 U/mL), mas, em cultivo agitado, o pico de atividade foi observado com 3,5 dias (13,82 U/mL).

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

O pH do meio de cultivo afeta o crescimento e a produção de enzimas dos micro-organismos, sendo cada espécie capaz de crescer dentro de um intervalo. As diversas espécies de micro-organismos apresentam diferentes tolerâncias ao pH, e isso indica a adaptação do organismo ao seu ambiente natural. A maioria dos ambientes naturais apresentam um valor de pH entre 5,0 e 9,0, e os organismos com pH ótimo neste intervalo são os mais comuns. O aumento ou a redução do pH do meio leva a uma diminuição das velocidades das reações metabólicas, devido a desnaturação das proteínas, consequentemente afetando a taxa de crescimento e a liberação de produtos para o meio extracelular (MADIGAN et al., 2010).

Neste trabalho foi avaliada a influência do pH inicial do meio sobre a produção de xilanases e sobre o crescimento, sendo os resultados apresentados na Figura 7. Dentro da faixa de pH avaliada (3,0 a 9,5) a maior atividade foi observada em pH 5,0 com 7,62 U/mL de atividade xilanase. A atividade xilanase específica também foi máxima neste mesmo pH com um total de 17,65 U/mg de proteína. Esses resultados são semelhantes aos apresentados em outros trabalhos que utilizaram espécies do gênero *Penicillium* para a produção de xilanases. A espécie *P. janczewskii*, em cultivo com bagaço de cevada, apresentou pH 6,0 como ótimo para produção de xilanases (TERRASAN et al., 2010). Já *P. sclerotiorum* produziu maior teor de xilanases em pH 6,5 em cultivo com xilano de aveia (KNOB, CARMONA, 2008). Em cultivo com *P. janthinelum*, Oliveira et al. (2006) obtiveram maior atividade nos cultivos com pH 5,5.

A maioria dos fungos filamentosos se desenvolvem bem em ambientes com pH levemente ácido, sendo este o caso da linhagem de *P. chrysogenum* em estudo. A melhor faixa de pH para o crescimento foi de 4,5 a 6,5, sendo que o crescimento máximo ocorreu em pH 6,0 correspondendo a 1,15 mg de proteínas intracelulares totais. Além disso, foi possível observar que, de modo geral, o pH aumentou durante o período de cultivo, resultando em pHs finais mais elevados que os iniciais. Nos cultivos realizados com pH inicial de 3,5 a 6,5, os pHs finais se elevaram até próximo da neutralidade. Já os meios com pHs iniciais maiores que 7,0 resultaram em pHs finais próximos a 9,0.



**Figura 7:** Influência do pH do meio de cultivo sobre a produção de xilanase por *Penicillium chrysogenum* (a), sobre o crescimento e pH final do meio (b). Cultivo estático em meio de Vogel suplementado com 1% de bagaço de cana-de-açúcar II (m/v), a 28 °C por 8 dias. (■) atividade xilanase (U/mL), (▒) atividade específica de xilanase (U/mg proteína extra.), (▨) proteína intracelular (mg), (●) pH final do meio de cultivo.

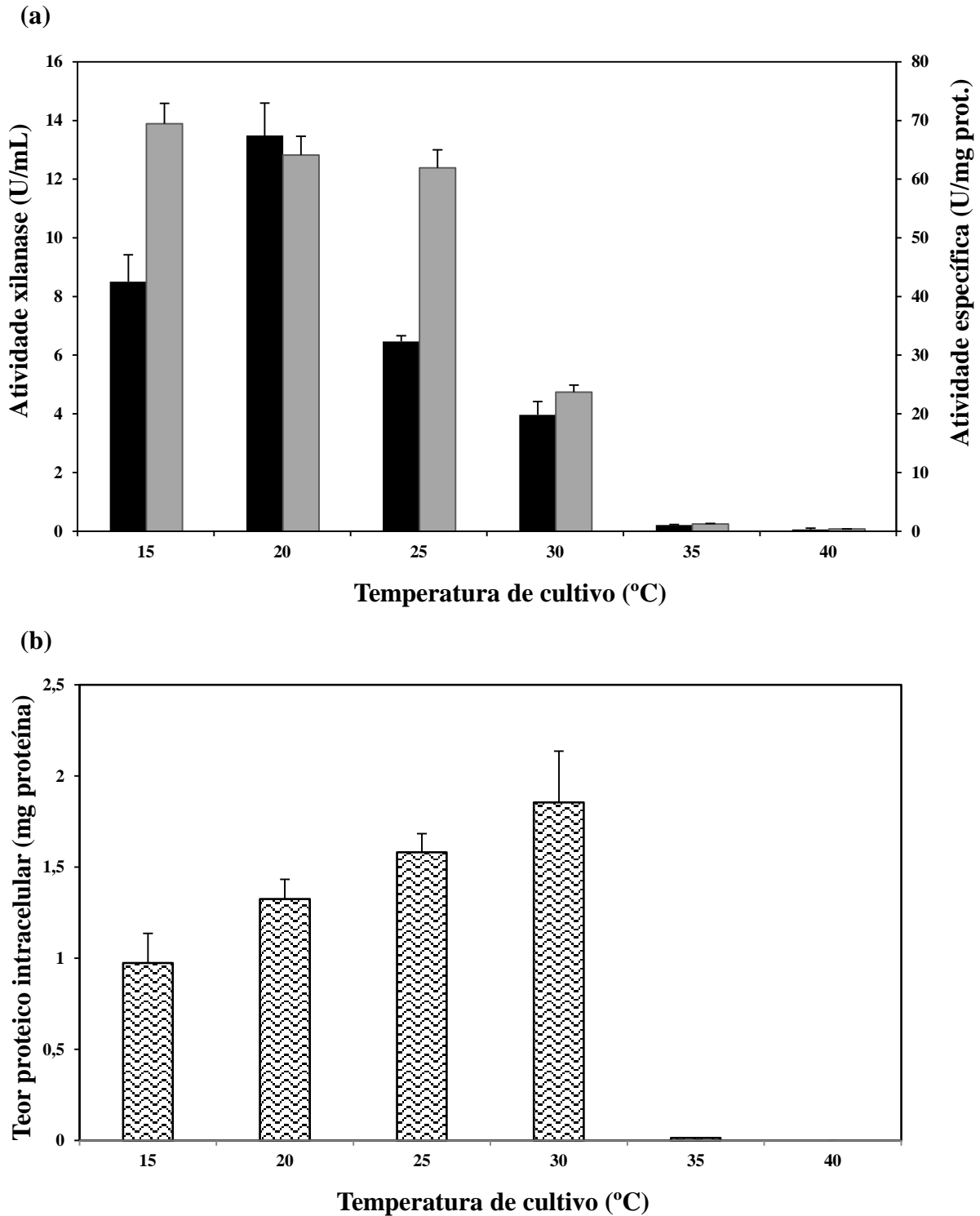
#### 4.1.5 Influência da temperatura de cultivo

A temperatura é um dos fatores mais importantes para o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos. Assim como o pH, cada micro-organismo apresenta um ponto mínimo, abaixo do qual não ocorre crescimento e um ponto ótimo no qual ocorre o crescimento mais rápido do micro-organismo, sendo que em temperaturas mais elevadas o crescimento diminui. Esses limites de temperatura podem variar de acordo com a composição do meio. Com o aumento da temperatura, as reações químicas e enzimáticas da célula são mais rápidas e o crescimento se acelera; porém com o aumento da temperatura, acima da temperatura ótima, ocorre desnaturação das proteínas, inativação e morte das células pelo rompimento celular (MADIGAN et al., 2010).

Com o cultivo da cepa de *Penicillium chrysogenum* em diferentes temperaturas foi possível verificar a melhor temperatura de crescimento e de produção de xilanases, conforme ilustrado na Figura 8. A temperatura ótima de crescimento foi de 30 °C correspondendo a 1,85 mg de proteínas intracelulares.

A temperatura influenciou a produção de xilanases de forma que o máximo de produção ocorreu a 20 °C com 13,48 U/mL, e nas demais temperaturas valores bastante inferiores foram observados. A atividade específica máxima ocorreu a 15 °C, devido à produção de menor quantidade de proteínas totais extracelulares do que a 20 °C; a atividade específica nesse caso atingiu o máximo de 69,45 U/mg de proteína, enquanto que a 20 °C foi 64,12 U/mg de proteína.

Em trabalhos que verificaram o efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanases foram relatadas diferentes respostas a variação de temperatura, conforme o meio de cultura e os micro-organismos utilizados. *Aspergillus foetidus* apresentou melhor temperatura de produção a 30° C, em cultivo com xilano de bétula (SHAH, MADAMWAR, 2005). *Aspergillus versicolor* cultivado em meio com farelo de trigo também produziu maior atividade xilanase em cultivo a 30° C (CARMONA et al., 1997). E, quando cultivada em xilano de aveia, uma cepa de *Aspergillus giganteus* apresentou pico de produção de xilanases a 25° C (COELHO, CARMONA, 2003).



**Figura 8:** Influência da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanase (a), e sobre o crescimento (b) de *Penicillium chrysogenum*. Cultivo estático em meio de Vogel, pH 5,0, suplementado com 1% de bagaço de cana-de-açúcar II (m/v), por 8 dias. (■) atividade xilanase (U/mL), (■) atividade específica de xilanase (U/mg proteína extra.), (▨) proteína intracelular (mg).



## 4.2 Purificação da xilanase produzida por *Penicillium chrysogenum*

### 4.2.1 Ensaio do teste em tubo

As melhores condições de cultivo obtidas para a produção de xilanase foram cultivos estáticos em meio de Vogel contendo 1% de bagaço de cana-de-açúcar II (m/v) como única fonte de carbono, pH 5,0 a 20 °C por 8 dias. Após a otimização passo a passo das condições de cultivo, a xilanase presente no filtrado enzimático foi purificada.

O teste em tubo foi realizado para determinação do trocador iônico e do pH mais apropriados para a cromatografia. O extrato bruto enzimático foi aplicado em diferentes tubos contendo cada trocador em seus respectivos tampões.

Na resina de troca aniônica DEAE Sephadex A-50, a xilanase não se adsorveu, apresentando baixa estabilidade aos tampões utilizados, como pode ser verificado na Tabela 4. Na resina de troca catiônica CM Sephadex C-50, a xilanase foi parcialmente adsorvida, apresentando maior adsorção e recuperação em pH 4,5. Assim a resina escolhida para a realização da cromatografia de troca iônica foi a CM Sephadex C-50, equilibrada em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5.

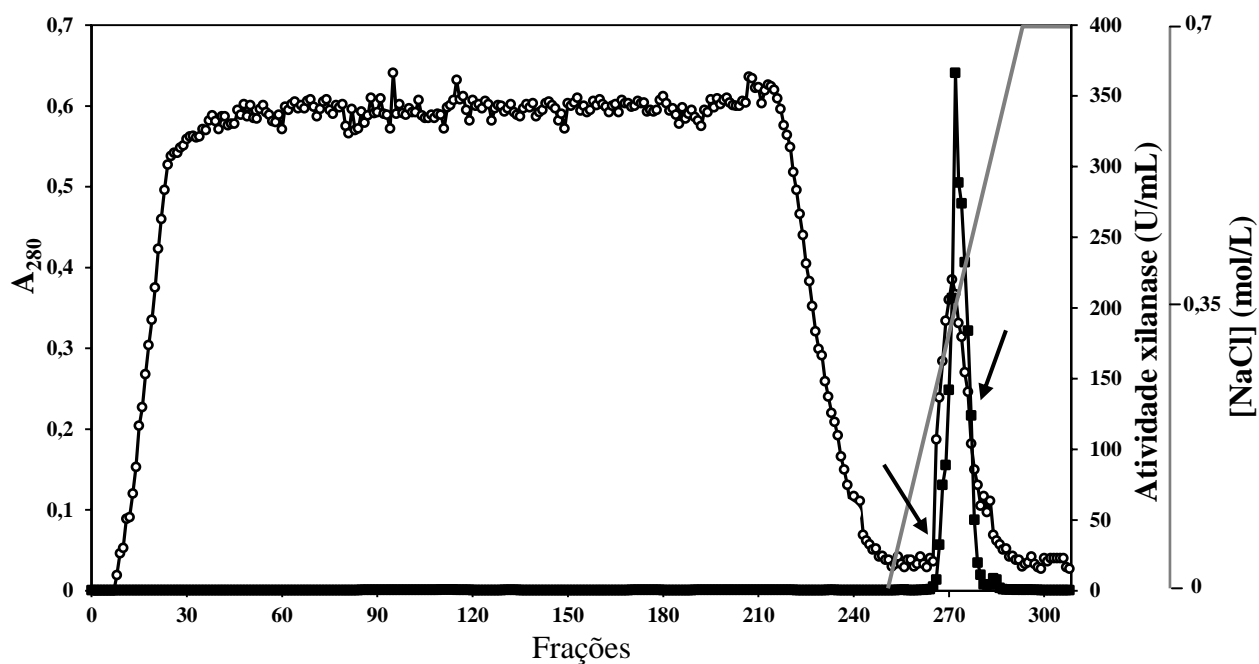
**Tabela 4.** Teste em tubo para seleção do trocador iônico e do pH de melhor desempenho para a realização da cromatografia de troca iônica.

Trocador	pH	Não adsorvida		Adsorvida	
		Atividade total (U)	Atividade relativa (%)	Atividade total (U)	Atividade relativa (%)
DEAE Sephadex A-50	5,0	2,77	45,60	1,24	20,40
	6,0	2,95	48,50	0,80	13,19
	7,0	3,13	51,49	0,45	7,40
	8,0	2,94	48,31	0,21	3,46
	9,0	1,56	25,63	0,16	2,69
CM Sephadex C-50	4,0	1,62	26,57	1,58	26,07
	4,5	0,96	15,79	2,38	39,19
	5,0	0,94	15,48	1,15	18,96
	5,5	1,57	25,82	0,27	4,50
	6,0	1,765	29,042	0,35	5,71
	7,0	3,117	51,288	0,03	0,47
	8,0	2,39	39,412	0,16	2,67

#### 4.2.2 Cromatografia de troca iônica

Para a realização da cromatografia de troca iônica, foi utilizado o filtrado enzimático bruto dialisado contra tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5, sendo a coluna equilibrada no mesmo tampão. À solução contendo a amostra foram adicionados 10% (v/v) de glicerol e 1mmol/L de ditioneitol (DTT) a cada 24 horas. O glicerol protege a proteína pois reduz a água disponível ao redor da enzima, mantendo sua estabilidade; o DTT, um agente redutor, protege a enzima da oxidação (SCOPEL, 1994). Em seguida, a amostra foi aplicada na coluna e eluída com um gradiente salino. O perfil de eluição obtido está apresentado na Figura 9.

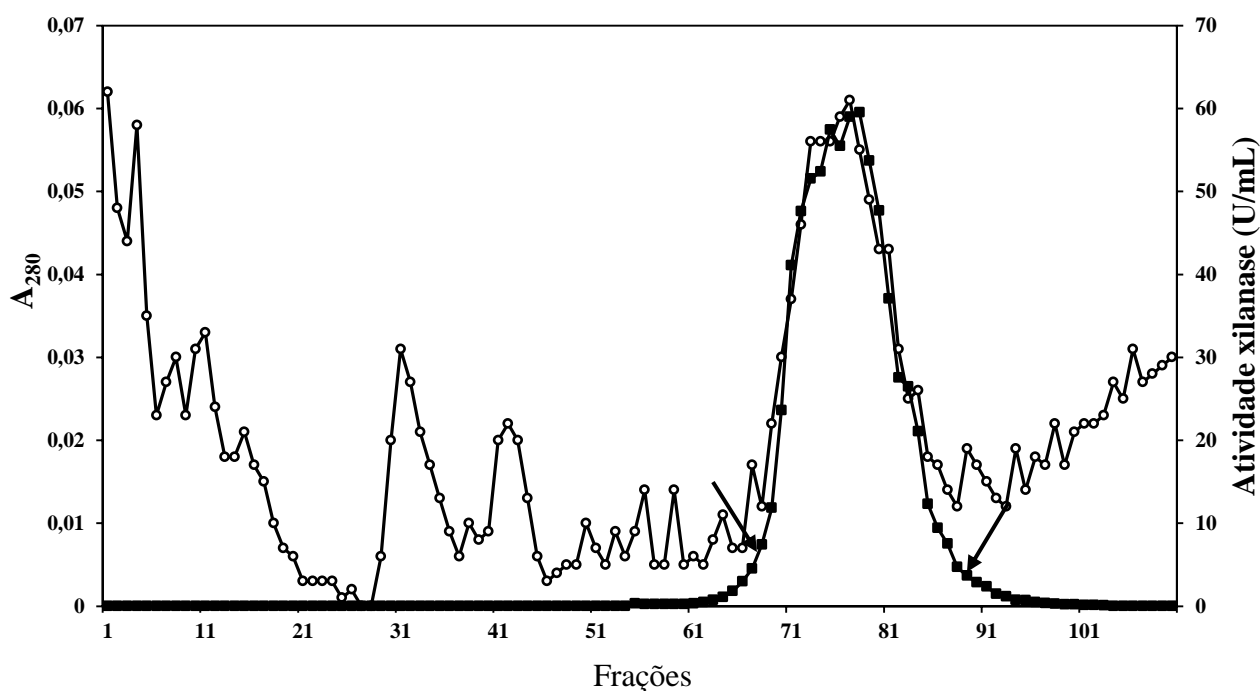
Pelo perfil cromatográfico é possível visualizar apenas um pico de atividade o que sugere a presença de uma única xilanase no extrato bruto enzimático produzido por essa linhagem de *P. chrysogenum*.



**Figura 9:** Perfil cromatográfico em CM Sephadex C-50 da xilanase de *Penicillium chrysogenum*. Tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5. (○)  $A_{280}$  (■) Atividade xilanase (U/mL) (—) Gradiente salino. As setas indicam as frações reunidas.

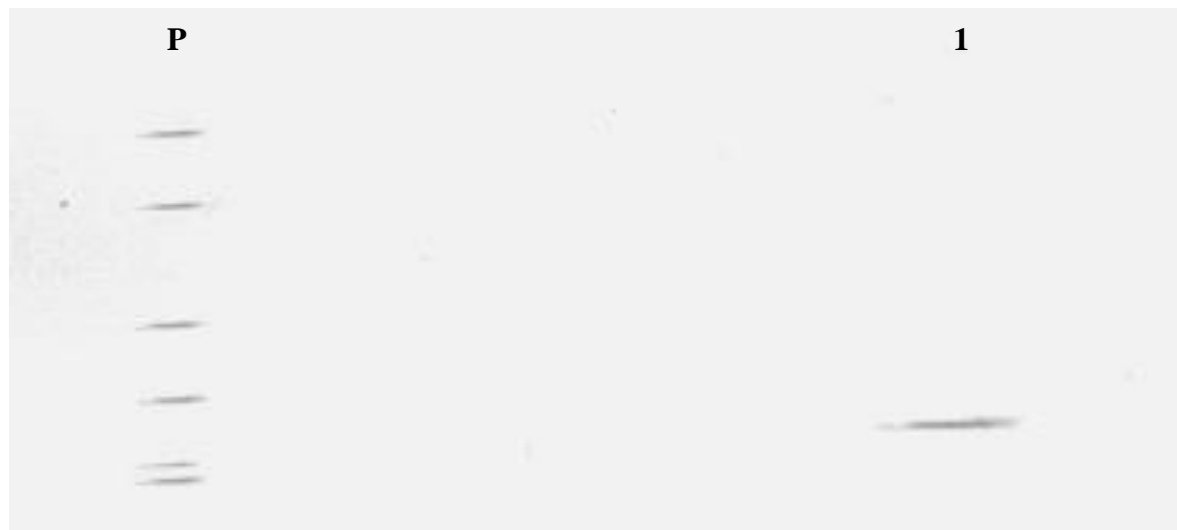
### 4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel

A amostra proveniente da cromatografia de troca iônica, foi dialisada contra tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5, liofilizada e aplicada à coluna Sephadex G-100 equilibrada no mesmo tampão. A atividade xilanase foi verificada em um único pico (Figura 10), sendo as frações correspondentes reunidas para caracterização.



**Figura 10:** Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 da xilanase de *Penicillium chrysogenum*. Tampão acetato de sódio 0,05 mol/L pH 4,5. (○)  $A_{280}$  (■) Atividade xilanase (U/mL). As setas indicam as frações reunidas.

Após liofilização de um determinado volume, a amostra da filtração em gel foi aplicada em um gel de poliacrilamida com SDS. Como pode ser observado na Figura 11, após a cromatografia de exclusão molecular, a amostra apresentou homogeneidade eletroforética.



**Figura 11:** PAGE-SDS em gradiente de 8-18% gel de poliacrilamida, da amostra (1) obtida após a etapa de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-100; (P) padrões: fosforilase b (94 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa)

Por eletroforese, a massa molar da xilanase purificada foi estimada em 22,1 kDa, de acordo com os padrões utilizados. Assim, a xilanase foi purificada (Tabela 5) com duas etapas de cromatografia: a primeira, uma cromatografia de troca iônica, que permitiu a purificação parcial da enzima, com um fator de 13,1 e recuperação de 29,8%. Após a segunda etapa, a cromatografia de exclusão molecular, foi obtido um fator de purificação de 24,9 e recuperação de 18,8%.

Em trabalhos anteriores que utilizaram outras linhagens dessa espécie, a presença de mais de uma xilanase foi comprovada. Medeiros (2007) identificou dois picos de atividade no perfil cromatográfico de troca iônica, realizado com um extrato bruto xilanolítico obtido do cultivo de uma linhagem de *P. chrysogenum*: uma xilanase foi adsorvida e a outra não. Ao final do experimento foi obtido um fator de purificação de 1,5 com recuperação de 14,19% para a xilanase I e fator de purificação de 75,77 com recuperação de 12,64 para a xilanase II.

Haas et al. (1992) detectaram a presença de apenas uma xilanase ativa no filtrado de cultura, obtido do cultivo de *P. chrysogenum* em xilano de aveia como única fonte de

carbono. Após duas etapas de purificação, uma cromatografia de troca iônica com resina DEAE-5-PW em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,0, e uma cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna Bio-Sil TSK250, foi obtido um fator de purificação de 4,1 com recuperação de 68% da enzima ativa.

**Tabela 5:** Purificação da xilanase de *Penicillium chrysogenum*.

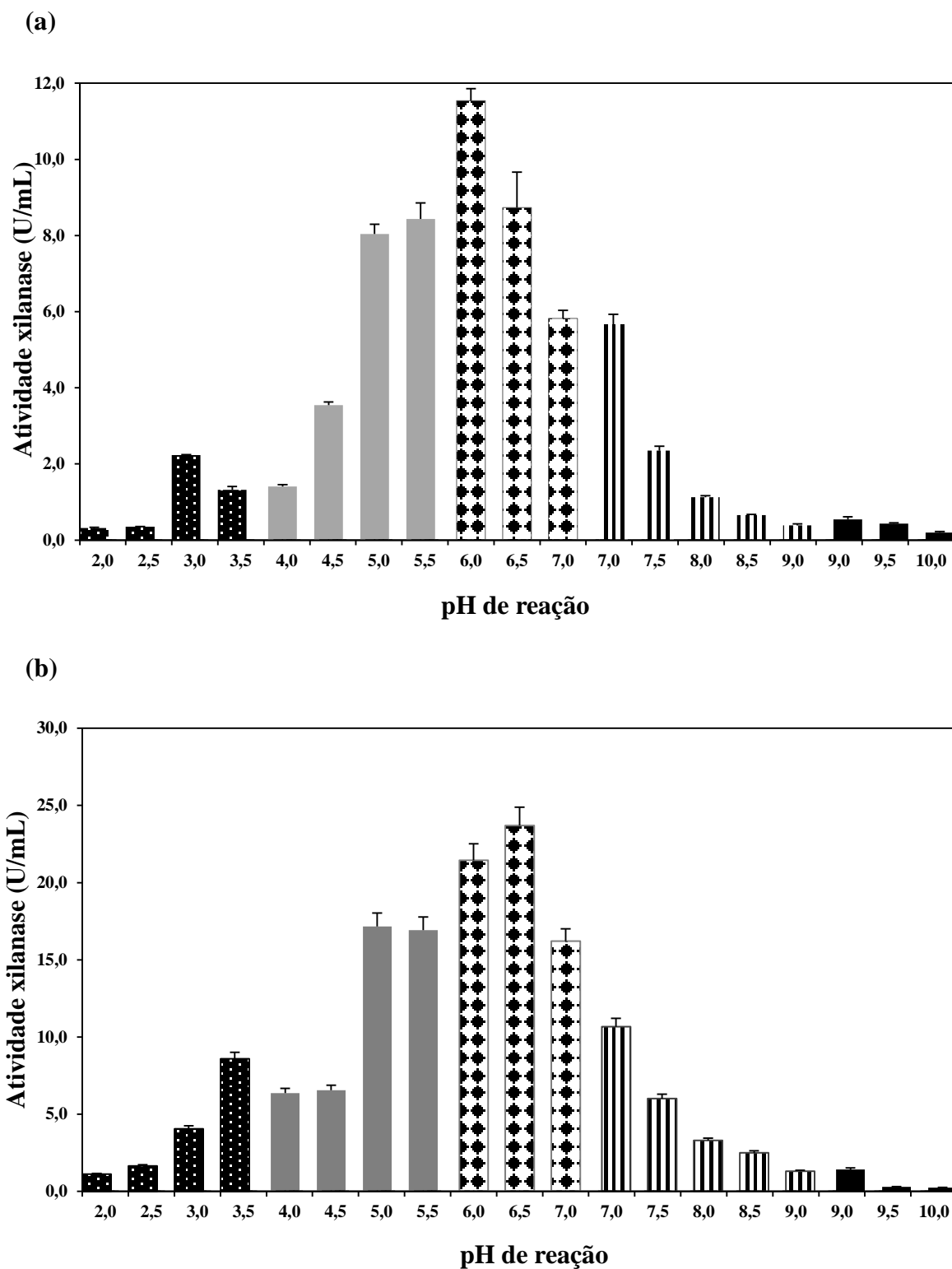
<b>Etapa de purificação</b>	<b>Atividade total (U)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade específica (U/mg de proteína)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Fator de purificação</b>
Filtrado bruto	9951,5	296,8	33,5	100	1,0
Filtrado bruto dialisado	6024,7	135,3	44,5	60,5	1,33
CM-Sephadex C-50	2972,8	6,8	438,3	29,8	13,1
Sephadex G-100	1872,0	2,2	834,2	18,8	24,9

### **4.3 Caracterização da xilanase bruta e da purificada**

#### **4.3.1 Efeito do pH e da temperatura de reação sobre a atividade xilanase**

O extrato bruto e a enzima purificada foram caracterizados em relação ao pH e temperatura ótimos para atividade.

Variando-se o pH do meio reacional, foi observado um máximo de atividade da enzima bruta, quando se utilizou tampão imidazol 0,05 M, pH 6,0, correspondendo a 11,54 U/mL (Figura 12). Valores acima de 8,0 U/mL foram observados em pH 5,0, 5,5 e 6,5; em todos os demais pHs, os valores de atividade observados foram menores que a metade da atividade máxima. A xilanase purificada apresentou condições ótimas de pH semelhantes, apresentando a maior atividade em tampão imidazol 0,05 M pH 6,5 com valor de 23,70 U/mL, sendo que na faixa de pH de 5,0 a 7,0 a atividade foi elevada. Nos demais pHs as atividades foram reduzidas a menos da metade da atividade máxima obtida.



**Figura 12:** Efeito do pH de reação sobre a atividade xilanase de *Penicillium chrysogenum* no bruta (a) e purificada (b). As reações foram realizadas a 50 °C nos tampões: (■) glicina HCl 0,05 mol/L; (▒) acetato de sódio 0,05 mol/L; (◻) imidazol 0,05 mol/L; (▨) tris HCl 0,05 mol/L; (■) glicina NaOH 0,05 mol/L.



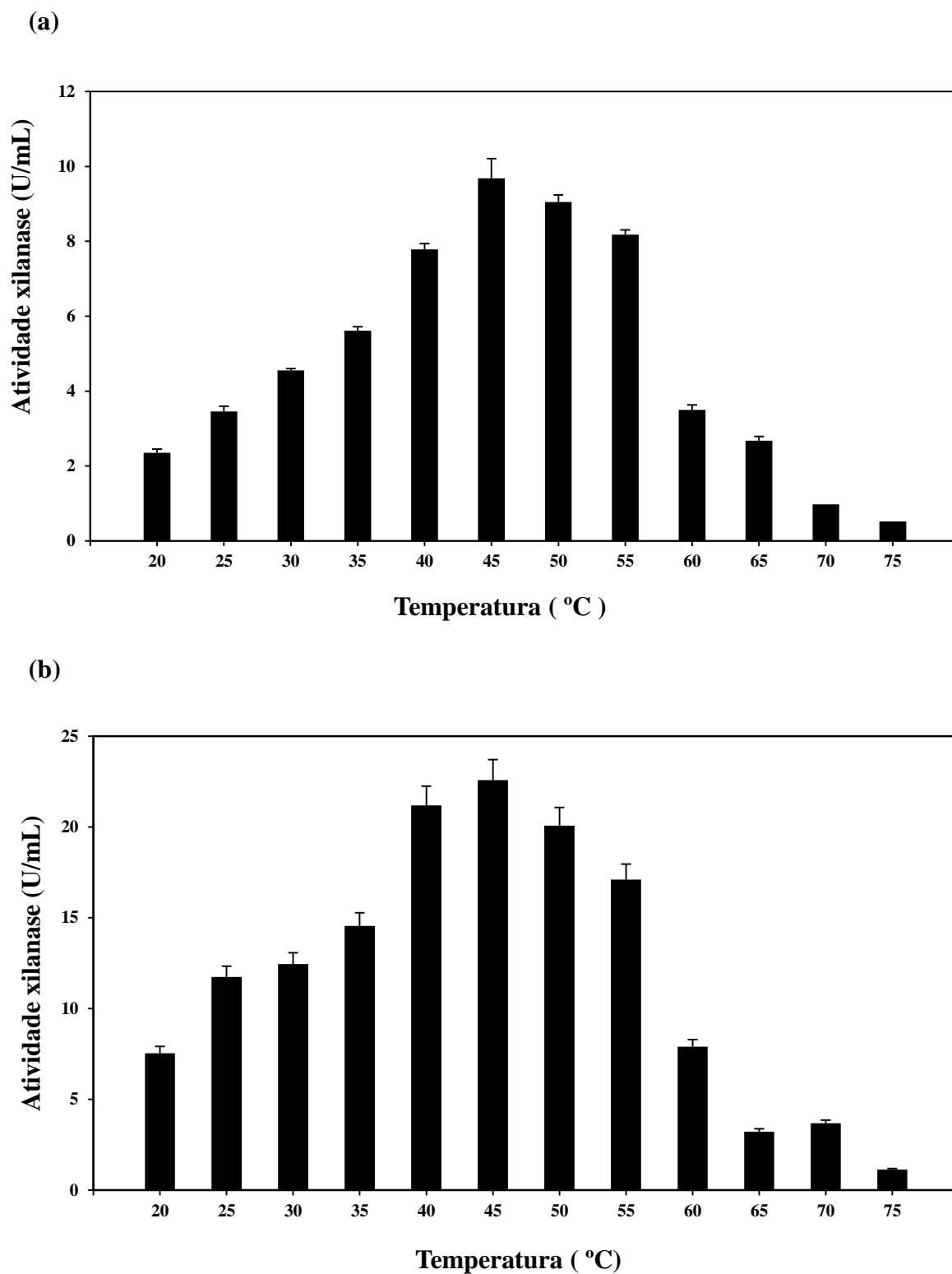
O perfil da atividade xilanase em função da temperatura pode ser visualizado na Figura 13.

A temperatura ótima de reação da atividade xilanase presente no filtrado bruto foi verificada em 45 °C, apresentando valor de 9,69 U/mL de atividade. Na temperatura de 50 °C também foi obtida elevada atividade, correspondendo ao valor de 9,05 U/mL, próximo daquele observado na temperatura ótima. Entre as temperaturas de 35 e 55 °C, a atividade xilanase do extrato bruto apresentou-se superior a 50% da atividade máxima. Nas demais temperaturas, a enzima bruta apresentou atividade reduzida a menos da metade.

A enzima purificada mostrou o mesmo perfil que a enzima bruta, com ótimo de temperatura em 45 °C, com valor de 22,57 U/mL; porém a enzima purificada se mostrou mais estável nas temperaturas menores do que 45 °C mantendo mais de 50% da atividade máxima na faixa de 25 a 55 °C. Em temperaturas superiores, a enzima purificada demonstrou queda de atividade como a da enzima bruta nas mesmas condições.

Em estudos de caracterização enzimática semelhantes, utilizando outras espécies de *Penicillium*, foram encontrados valores próximos de pH e de temperatura ótimos de atividade xilanase para *Penicillium purpurogenum* (BELANCIC, 1995), *Penicillium sclerotiorum* (KNOB; CARMONA, 2008) e *Penicillium occitanis* (DRISS et al., 2011).

Haas et al. (1992) caracterizaram a xilanase produzida por uma linhagem de *P. chrysogenum* e verificaram que as melhores condições de reação em pHs entre 5,0 e 7,0, nos quais a enzima apresentou de 90 a 100% da atividade máxima. Em cultivos dessa linhagem, o efeito da temperatura sobre a atividade xilanase também foi avaliado, e a atividade máxima ocorreu a 40 °C. Medeiros (2007) verificou que as xilanases de outra linhagem de *P. chrysogenum* apresentaram pH ótimo entre 4,5 e 5,5, mas uma apresentou maior estabilidade do que a outra, em todos os pHs. Estas enzimas foram avaliadas quanto a temperatura ótima e constatou-se que para o extrato enzimático bruto foi de 45 °C, sendo que para a xilanase I foi de 50 °C; e para a xilanase II foi de 40 a 50 °C.



**Figura 13:** Efeito da temperatura de reação sobre a atividade xilanase de *Penicillium chrysogenum* no extrato bruto (a) e na enzima purificada (b). As reações foram realizadas em tampão imidazol 0,05 mol/L, pH 6,0 para o extrato bruto, e pH 6,5 para a enzima purificada.

### 4.3.2 Estabilidade a temperatura e ao pH da atividade xilanase

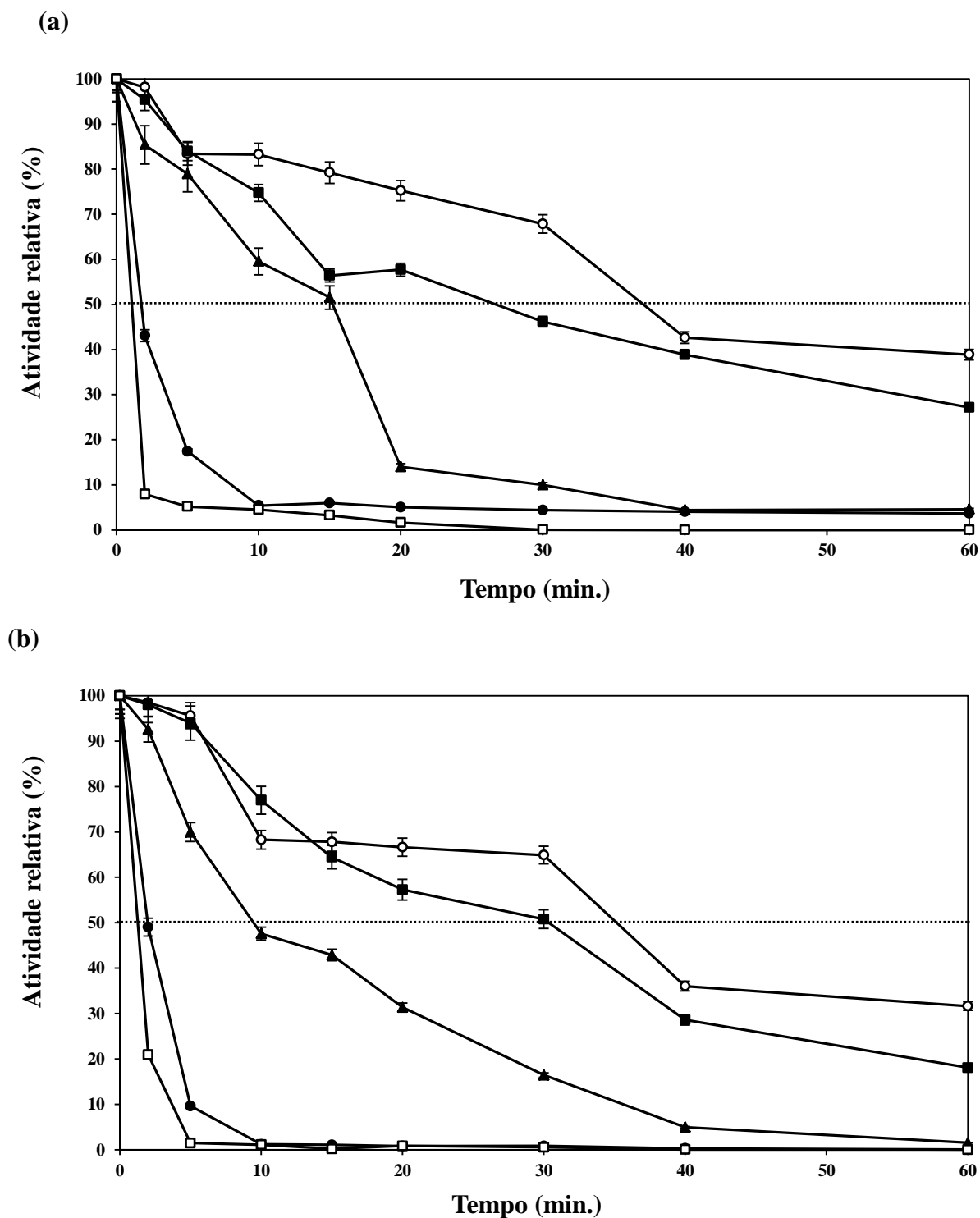
A enzima bruta e a purificada foram avaliadas quanto a estabilidade nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C (Figura 14),

A enzima bruta apresentou boa estabilidade a 40 °C, mantendo mais de 40% da atividade por 60 minutos de incubação. A meia vida nessa temperatura foi de 37 minutos, e nas temperaturas de 45, 50, 55 e 60 °C a meia vida foi de 28, 16, 2 e 1 minutos, respectivamente.

A 40 °C a xilanase purificada manteve a atividade próxima de 40% por 40 minutos de incubação, sendo a meia vida de 35 minutos nessa temperatura. A 45 e a 50 °C a estabilidade foi menor, mas se manteve com mais de 60% de atividade por 10 minutos. A estabilidade foi menor nas temperaturas de 55 °C e 60 °C, sendo a atividade reduzida, nessas temperaturas, a menos de 20% após 5 minutos de incubação. O tempo de meia vida para a enzima purificada foi de 35, 31, 10, 3 e 2 nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60 °C, respectivamente.

Na determinação da estabilidade térmica da xilanase de *Penicillium occitanis*, Driss et al. (2011) verificaram alta estabilidade em temperaturas entre 45 °C e 60 °C, sendo mantida mais de 50% da atividade inicial depois de 1 hora de incubação. Já para a xilanase de *Aspergillus foetidus*, Shah e Madamwar (2005) detectaram baixa estabilidade em temperaturas superiores a 50° C.

A termoestabilidade da xilanase de uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* (HAAS et al., 1992) apresentou meia vida de 8 horas a 40 °C e de 1 hora a 50 °C. Medeiros (2007) avaliou a estabilidade das duas xilanases produzidas por *Penicillium chrysogenum*, sendo a meia vida da xilanase I de 133 minutos a 40 °C, enquanto que à mesma temperatura, a meia vida da xilanase II não foi determinada, porque esta apresentou atividade relativa maior que 50% após 270 minutos de incubação.



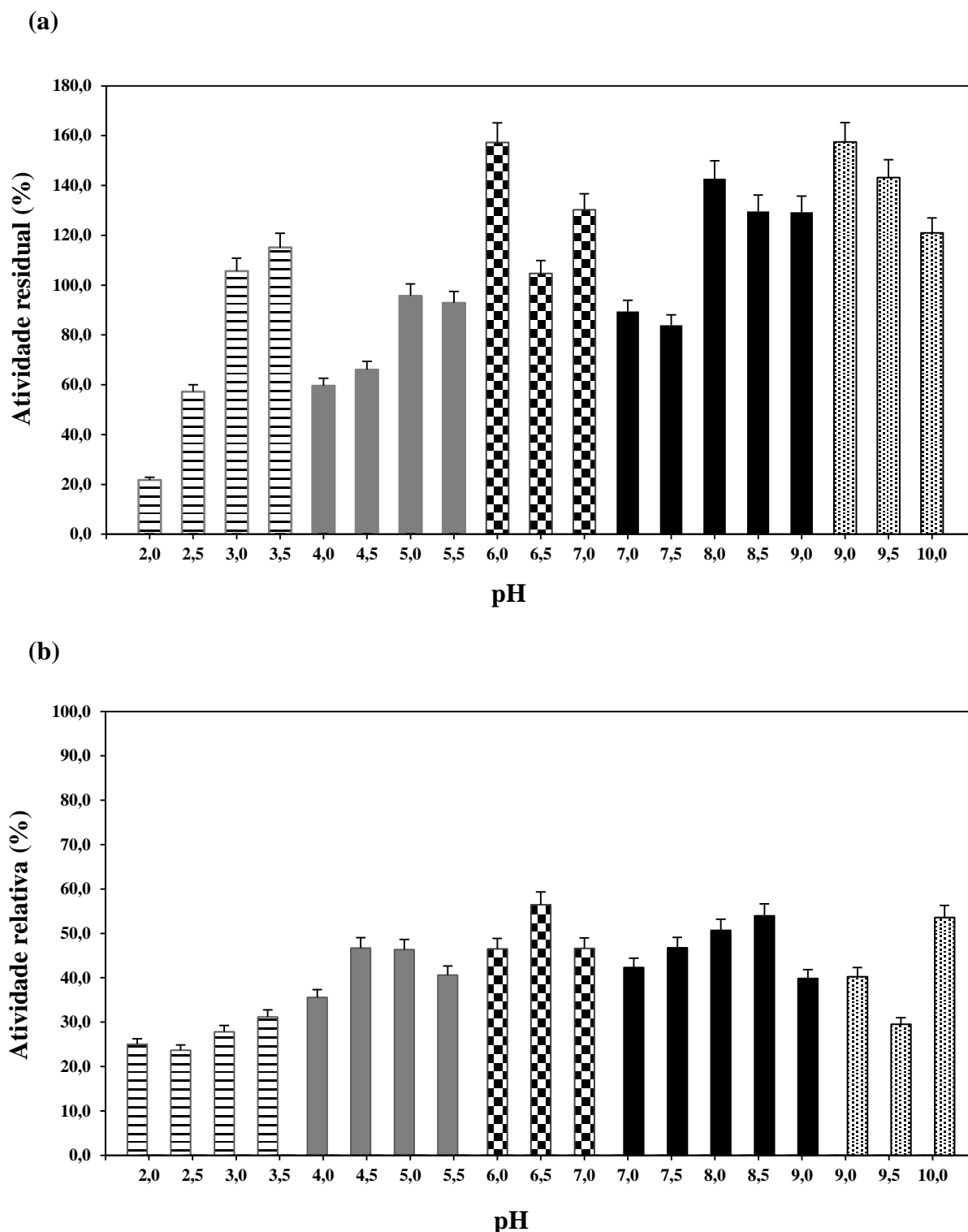
**Figura 14:** Estabilidade térmica do extrato bruto (a) e da xilanase purificada (b) de *Penicillium chrysogenum*. As amostras foram incubadas a (○) 40 °C, (■) 45 °C, (▲) 50 °C, (●) 55 °C e (□) 60 °C na ausência de substrato. As reações foram realizadas em tampão imidazol 0,05 mol/L, pH 6,0 a 45 °C.

A estabilidade em diferentes pHs, da xilanase de *P. chrysogenum*, presente no filtrado bruto e da enzima purificada, foi avaliada incubando-se as amostras em soluções tampões com diferentes pHs por 24 horas, a 4 °C, na ausência de substrato. Após o período de incubação, a atividade residual foi determinada e a atividade relativa foi calculada em função da atividade obtida da xilanase bruta e da purificada sem incubação (Figura 15).

O extrato enzimático bruto apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH, especialmente nos pHs 3,0 e 3,5 e de 6,0 a 10,0. Nos pHs 6,0, 7,0 e de 8,0 a 9,5 a atividade foi maior que a atividade do extrato bruto sem incubação, resultando em mais de 100% de atividade nesses pHs. Valores de pHs ácidos, como 2,0 e 2,5, diminuíram a estabilidade da enzima, reduzindo a menos de 50% a atividade dessas amostras.

A atividade xilanase da enzima purificada apresentou menor estabilidade em toda a faixa de pH testada, mantendo de 30% a 50% de atividade nos pHs de 4,5 a 10,0. A maior estabilidade ocorreu em tampão imidazol pH 6,5, com cerca de 55% da atividade preservada.

A xilanase purificada por Haas et al. (1992) apresentou atividade de 81% em pH 4,0 e de 98% em pH 8,0 após a incubação por 24 horas. A xilanase I purificada por Medeiros (2007) apresentou atividade de mais de 60% nas faixas de pH entre 3,5 e 7,5; a xilanase II, por sua vez, apresentou atividade de mais de 70% em todos os pHs avaliados.



**Figura 15:** Estabilidade ao pH da atividade xilanase de *Penicillium chrysogenum*. As amostras foram incubadas por 24 horas a 4 °C, na ausência de substrato, com os tampões: (⊖) glicina HCl 0,05 mol/L; (■) acetato de sódio 0,05 mol/L; (▣) imidazol 0,05 mol/L; (■) tris HCl 0,05 mol/L; (▤) glicina NaOH 0,05 mol/L. As reações enzimáticas foram realizadas em tampão imidazol 0,05 mol/L, pH 6,0 para o extrato bruto e pH 6,5 para a enzima purificada, a 45 °C.

### 4.3.3 Efeito de substâncias e íons

O efeito de diversas substâncias e íons metálicos sobre a atividade xilanase foi avaliado, em reação contendo tampão imidazol 0,05 mol/L pH 6,0 para o extrato bruto, e pH 6,5 para a enzima purificada, a 45 °C. As concentrações das substâncias utilizadas nos testes foram de 2 e 10 mmol/L. A xilanase purificada foi caracterizada na presença de 1mmol/L de DTT e 10% de glicerol remanescentes da purificação.

Como se pode observar na Tabela 6, o extrato bruto enzimático apresentou aumento da atividade na presença dos íons  $Mg^{+2}$  e das substâncias glicerol, DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol, e sofreu inibição na presença de  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ , PMSF e SDS. A enzima purificada foi ativada na presença de  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  a 10 mmol/L, DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol, mas foi inibida por  $Cu^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ , e SDS. O SDS, sendo um detergente, atua sobre as regiões hidrofóbicas de proteínas, causando sua desnaturação (NELSON, COX, 2011), e a xilanase mais atividade com 10 mM desse agente. O sítio ativo de uma enzima contém resíduos de aminoácidos que podem sofrer reações interferindo na capacidade catalítica da enzima; muitos deles são mais suscetíveis a oxidações, como é o caso da cisteína, um aminoácido muito propenso à oxidação pela presença de grupos sulfidril em sua molécula. A presença de alguns íons de metais pesados, no meio de reação, pode acelerar a oxidação dos grupos tiol, fazendo com que a atividade enzimática diminua drasticamente (SCOPEES, 1994). A inibição por metais pesados sugere que a xilanase em estudo apresenta grupos  $-SH$ . A presença de grupos tiol é comprovada pela ativação da enzima na presença de DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol; estes são reagentes redutores, que contem grupos sulfidril, os quais sofrem oxidação no lugar dos  $-SH$  desse aminoácido da proteína. Assim esses reagentes protegem os grupos tiol da cisteína prevenindo sua oxidação (SCOPEES, 1994; NELSON, COX, 2011). A xilanase purificada não apresentou grande ativação na presença de DTT devido a presença prévia desse reagente na amostra.

O fluoreto de metilsulfonila – PMSF – é inibidor de enzimas proteolíticas, especialmente serino e cisteíno peptidases com resíduos de serina e cisteína, respectivamente, e algumas carboxipeptidases (SCOPEES, 1994; NELSON AND COX, 2011). A xilanase sofreu pouca inibição na presença de PMSF, sendo que o extrato bruto foi mais afetado quando na concentração de 10 mM dessa substância.

As enzimas podem sofrer perda de atividade em soluções aquosas muito diluídas (entre 1 e 2% de proteína). Isso ocorre devido à desestabilização dessas proteínas e consequente desnaturação conformacional que levam a inativação. Reduzindo-se a atividade

de água ao redor das proteínas, obtém-se um ambiente próximo ao natural, ao qual a enzima está adaptada, sendo assim possível manter sua estabilidade e atividade. O glicerol forma ligações de hidrogênio fortes com a água, reduzindo de forma eficaz o movimento das moléculas, reduzindo a atividade de água na solução (SCOPES, 1994). A adição de uma porcentagem de glicerol na reação, e em todas as etapas de purificação, aumentou a atividade xilanase e permitiu maior recuperação dessa enzima.

**Tabela 6:** Efeito de substâncias sobre a atividade xilanase

Substância	Extrato enzimático bruto		Xilanase purificada	
	Atividade relativa (%)			
	2 mmol/L	10 mmol/L	2 mmol/L	10 mmol/L
Controle	100	100	100	100
NaCl	94,3 ± 1,0	91,2 ± 5,6	88,0 ± 1,0	87,7 ± 0,5
CaCl <sub>2</sub>	87,4 ± 0,4	33,3 ± 1,7	69,4 ± 1,5	106,5 ± 3,6
MgSO <sub>4</sub>	97,3 ± 2,4	105,9 ± 0,7	118,9 ± 2,6	175,3 ± 4,1
ZnSO <sub>4</sub>	87,9 ± 1,0	68,7 ± 2,4	100,4 ± 3,1	93,8 ± 10,2
NH <sub>4</sub> Cl	98,7 ± 2,4	104,7 ± 3,8	94,9 ± 2,6	89,5 ± 6,2
BaCl <sub>2</sub>	91,8 ± 3,1	98,0 ± 2,8	96,7 ± 2,0	117,8 ± 5,1
MnSO <sub>4</sub>	99,2 ± 0,3	86,9 ± 1,4	88,7 ± 2,1	138,5 ± 3,6
CuCl <sub>2</sub>	14,5 ± 0,4	3,7 ± 1,2	18,9 ± 4,1	7,6 ± 1,0
HgCl <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	74,4 ± 2,8	66,5 ± 2,8	85,8 ± 3,1	81,1 ± 5,6
Acetato de chumbo	ND	ND	ND	ND
Acetato de amônio	88,2 ± 1,5	84,7 ± 0,8	99,6 ± 8,2	78,91 ± 5,6
Citrato de sódio	94,8 ± 5,2	97,5 ± 4,1	103,6 ± 0,5	93,1 ± 1,1
Glicerol*	116,5 ± 3,1	130,8 ± 3,1	107,3 ± 6,7	108,0 ± 4,6
PMSF	86,9 ± 5,2	80,3 ± 2,2	103,6 ± 2,6	98,9 ± 3,1
DTT	108,4 ± 1,2	150,9 ± 2,4	101,1 ± 6,2	103,7 ± 2,5
β-mercaptoetanol	105,2 ± 3,8	139,9 ± 3,5	101,4 ± 6,7	110,9 ± 3,6
SDS	77,6 ± 1,0	61,1 ± 2,1	92,4 ± 5,6	81,1 ± 0,1
EDTA	93,1 ± 0,2	91,1 ± 4,2	97,1 ± 6,7	86,5 ± 3,1

\* Concentração do glicerol: 2% e 10%



#### 4.4 Comparação das propriedades de xilanases isoladas de diferentes linhagens de *Penicillium chrysogenum*

Diversos trabalhos de produção, purificação e caracterização de xilanases de linhagens de *P. chrysogenum* já foram realizados. A comparação das propriedades das xilanases purificadas, bem como as condições de cultivo utilizadas para a produção dessa enzimas por essas linhagens, podem ser visualizadas na Tabela 7.

Para obtenção de xilanases, Haas et al. (1992) cultivaram uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* em meio líquido, contendo alguns sais e xilano de aveia como fonte de carbono, sob condição agitada a 150 rpm, em pH 6,0, por 2 dias a 25 °C. As culturas foram filtradas e a xilanase, presente no extrato obtido, foi purificada e caracterizada. A temperatura ótima de reação foi a 40 °C e o pH 6,0.

Hou et al. (2006) isolaram uma linhagem de *P. chrysogenum* de sedimentos do Mar Amarelo, no Pacífico, e este fungo apresentou bom crescimento a temperaturas entre 4 e 20 °C. Esta linhagem apresentou uma xilanase com alta atividade em baixas temperaturas (2 - 15 °C). O gene da xilanase foi isolado, a sequência de aminoácidos codificada por esse gene foi deduzida, sendo verificada homologia com as sequências de aminoácidos das xilanases da família GH 10. Após a clonagem do gene, a proteína codificada foi superexpressa em *Escherichia coli*, e este produto de expressão foi purificado. Essa xilanase purificada apresentou pH ótimo de reação de 5,5 e temperatura ótima de 25 °C.

A linhagem IFO-4626 foi cultivada por Medeiros (2007) em meio mínimo contendo xilano de aveia como fonte de carbono, pH 7,0, por 3 dias a 25 °C. A partir do filtrado bruto foram purificadas duas xilanases, que apresentaram características distintas. A xilanase I apresentou massa molecular estimada de 12,6 kDa, pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 50 °C. Já a xilanase II teve sua massa estimada em 20 kDa, e ótimos de pH e temperatura de 4,5 a 5,5 e de 40 a 50 °C, respectivamente.

Okafor et al. (2007) verificaram a produção de xilanases pela linhagem de *P. chrysogenum* PCL501, cultivada nos resíduos agroindustriais farelo de trigo, serragem de madeira e bagaço de cana-de-açúcar. A maior produção foi obtida em cultivos em meio líquido com farelo de trigo como fonte de carbono, em pH 5,6, por 4 dias de cultivo a 30 °C, sendo que os autores não purificaram nem caracterizaram a xilanase produzida.

**Tabela 7:** Características bioquímicas de xilanases de linhagens de *Penicillium chrysogenum*

Linhagem	Isoforma	Condições de cultivo	Massa molecular (kDa)	Atividade ótima		Referência
				pH	Temperatura (°C)	
<i>P. chrysogenum</i> Q 176	—	Xilano de aveia, pH 6,0 2 dias 25 °C	—	6,0	40	Haas et al. (1992)
<i>P. chrysogenum</i> FS010	Recombinante XYL	—	—	5,5	25	Hou et al. (2006)
<i>P. chrysogenum</i> IFO-4626	I	Xilano de aveia	12,6	5,0	50	Medeiros (2007)
	II	pH 7,0 3 dias 25 °C.	20	4,5-5,5	40-50	
<i>P. chrysogenum</i> PCL501	—	Farelo de trigo pH 5,6 4 dias 30 °C	—	—	—	Okafor et al. (2007)
<i>P. chrysogenum</i> F-15	—	Bagaço de cana-de-açúcar pH 5,0 8 dias 20 °C	22,1	6,5	45	Este trabalho

Em resumo, as xilanases produzidas por linhagens de *P. chrysogenum* apresentam massas moleculares entre 12,6 e 22,1 kDa, pH ótimo, geralmente pouco ácido, variando de 4,5 a 6,5 e temperatura ótima de 40 a 50 °C, com exceção da xilanase da linhagem psicrófila isolada por Hou et al. (2006).

Assim pode-se verificar que linhagens diferentes de uma mesma espécie, podem produzir isoenzimas diferentes. Dentre os fatores que podem afetar a expressão e as características das xilanases estão a composição do meio de cultura e o tempo de cultivo, bem como outros parâmetros, como o pH, a temperatura de cultivo e a agitação (KULKARNI et al., 1999).

## 5 Conclusões

A linhagem de *Penicillium chrysogenum* em estudo apresentou-se como boa produtora de xilanases extracelulares em diferentes fontes de carbono, incluindo alguns resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de cevada, sendo que a granulometria do bagaço de cana-de-açúcar influenciou no crescimento do micro-organismo e na produção dessa enzima.

A melhor condição de cultivo em meio líquido de Vogel foi verificada com 1% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar, de granulometria entre 2 e 1 mm, por 8 dias, estático, a pH 5,0 e temperatura de 20 °C. Apesar do maior período para atingir o pico de produção, o cultivo estático se mostrou mais vantajoso, pois neste, o nível de atividade foi 2,2 vezes maior do que no cultivo agitado.

A xilanase de *P. chrysogenum* foi purificada de forma relativamente rápida, utilizando-se apenas duas etapas cromatográficas. A xilanase bruta e a purificada apresentaram propriedades semelhantes, no entanto a xilanase bruta apresentou maior estabilidade a variações de pH. A maior estabilidade da xilanase em pHs elevados permite sua aplicação em processos que utilizem reações alcalinas. A estabilidade em temperaturas próximas a 40 °C permite sua aplicação na indústria de bebidas, na panificação, na produção de xilooligossacarídeos, em rações animais, e na degradação de resíduos vegetais para a produção de etanol.

A enzima purificada e o extrato enzimático bruto apresentaram aumento de atividade na presença de DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol, indicando a importância de grupos tiol de cisteína para a estrutura tridimensional desta enzima.

Com base nos resultados obtidos, foi possível comparar as propriedades da xilanase produzida por essa linhagem com xilanases obtidas de outras linhagens de *Penicillium chrysogenum*, indicando que essa apresenta pH ótimo próximo da neutralidade, e pH ótimo mais elevado que as demais, bem como estabilidade em região alcalina.

A utilização de resíduos agroindustriais, na produção de xilanases, é uma tecnologia promissora e vantajosa, pois permite uma destinação mais adequada desse material, reduzindo os custos de produção de enzimas, por serem materiais abundantes e de baixo custo. O bagaço

de cana-de-açúcar pode ser usado como substrato, nesse caso, pois apresentou produção em níveis superiores aos obtidos com xilano de aveia.

Este trabalho forneceu conhecimentos básicos a respeito das características da xilanase produzida por essa linhagem de *P. chrysogenum*, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de futuros trabalhos, como a imobilização da enzima em resíduos agroindustriais, ou outros suportes, visando sua aplicação industrial.

## 6 Referências

AHMAD, Z. **Production and characterization of xylanase for utilization in baking industry**. 2009. 207 f. Dissertação (Doctor of Philosophy in Food Technology) – National Institute of Food Science and Technology University of Agriculture, Faisalabad, 2009.

AHMED, S., JABEEN, A., JAMIL, A. Xylanase from *Trichoderma harzianum*: enzyme characterization and gene isolation. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, vol. 29, n. 2, p. 176-182, 2007.

ALBERTON, L. R. **Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por *Streptomyces viridosporus* T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária**. 2004. 131 f. Tese (Doutorado em Processos biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2004.

AQUARONE, E., BORZANI, W., LIMA, U.A. **Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda., 1990, v. 2, 231p.

ARO, N., PAKULA, T., PENTTILÄ. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, p. 719-739, 2005.

BAILEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, vol. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, vol. 15, p. 147-157, 1999.

BEG, Q.K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 56, p. 326-338, 2001.

BELANCIC, A., SCARPA, J., PEIRANO, A., DÍAZ, R., STEINER, J., EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal of Biotechnology**, vol. 41, p. 71-79, 1995.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, vol. 18, p. 355-383, 2000.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, vol. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIELY, P., PULS, J., SCHENEIDER, H. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. **FEBS Letters**, vol. 186, p. 80-84, 1985.

BIELY, P., VRSANSKA, M., TENKANEN, M., KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, vol. 57, p. 151-166, 1997.

CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research** vol. 37, p. 233-238, 2009.

CARMONA, E.C., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., MONTEIRO, R.T.R., JORGE, J.A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 37, n.6, p. 387-394, 1997.

CARMONA, E.C., BROCHETO-BRAGA, M.R., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 166, p. 311-315, 1998.

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R.A., ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, vol. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, A.M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol. 33, p. 181-188, 2010.

COELHO, G.D., CARMONA, E.C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 43, p. 269-277, 2003.

COELHO, M.A.Z., LEITE, S.G.F., ROSA, M.F., FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, vol. 19, p. 33-42, 2001.

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 29, p. 3-23, 2005.

COWAN, W.D., Animal feed. In: GODFREY, T., WEST, S. editors. **Industrial Enzymology**. 2 ed. London: Macmillan Press, p.360-371, 1996.

DAMASCO, M.C.T., ANRADE, C.M.M.C, PEREIRA JR., N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 84, p. 821-834, 2000.

de VRIES, R.P., VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, vol. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DODD, D., CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, vol. 1 n. 1, p. 2-17, 2009.

DRISS, D., BHIRI, F., ELLEUCH, L., BOULY, N., STALS, I., MILED, N.; BLIBECH, M., GHORBEL, R., CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of an extracellular acidophilic endo-1,4- $\beta$ -xylanase, naturally deleted in the “thumb”, from *Penicillium occitnais* Pol6. **Process Biochemistry**, vol. 46, p. 1299-1306, 2011.

EBRINGEROVA, A., HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - bipolymers with valuable properties. 1, Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, vol. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.

EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. **Advances in Polymer Science**, vol. 186, p. 1-67, 2005.

FILHO, E.X.F. Xilanases. In: SAID, S., PIETRO, R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, v. 1, p. 137-148, 2004.

GALANTE, Y. M., DE CONTI, A., MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: **Trichoderma and Gliocladium – Enzymes, Biological Control and Commercial Applications**. HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. (eds), p. 327–342. London: Taylor and Francis, 1998.

GILBERT, H.J., HAZLEWOOD, G.P. Bacterial cellulases and xylanases. **Journal of General Microbiology**, vol.139, p.187-194,1993.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, vol. 153, p. 444-455, 2010.

GÍRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, vol. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GODFREY, T., WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T., WEST, S. editors. **Industrial Enzymology**, 2 ed. London: Macmillan Press, p. 1-8, 1996.

GRASIN, C., FAUQUENBERGUE, P. Fruit juices. In: GODFREY, T., WEST, S. editors. **Industrial Enzymology**. 2 ed. London: Macmillan Press, p. 226-264, 1996.

GRAY, K.A., ZHAO, L.S., EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol.10, n.2, p. 141-146, 2006.

HAAS, H., HERFURTH, E., STÖFFLER, G., REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1117, p. 279-286, 1992.

HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K.D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanase. **Bioresource Technology**, vol. 58, p. 137-161, 1996.

HOU, Y. H., WANG, T. H., LONG, H., ZHU, H. Y. Novel cold-adaptative *Penicillium* strain FS secreting thermo-labile xylanase isolated from Yellow Sea. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, vol. 38, n. 2 p. 1-8, 2006.

HOWARD, R.L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENBURG, E.L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, vol. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

KANTELINEN, A., HORTLING, B., SUNDQUIST, J., LINKO, M., VIKARI, L. Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. **Holzforschung**, vol. 47, p. 318-324, 1993.



KNOB, A., CARMONA, C.C. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. **World Applied Sciences Journal**, vol. 4, p. 277-283, 2008

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 23, n.4, p. 411-456. 1999.

KUNG, L. Jr., KRECK, E.M., TUNG, R.S., HESSION, A.O., SHEPERD, A.C., COHEN, M.A., SWAIN, H.E., LEEDLE, J.A.Z. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 80, p. 2045-2051, 1997.

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

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, vol. 56, p. 1-24, 1997.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 193, p. 265-275, 1951.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 146f. Tese (Doutorado em Processos biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2006.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo – SP: Prentice Hall, 624 p, 2004.

MCNEILL, M., DARVILL, A.G., Fry, S.C., ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 53, p. 625-663, 1984.

MEDEIROS, L. A. **Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera**. 126 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MENÉNDEZ, J. L. **Los hongos. El reino de los mycetes.** 2004. Disponível em: <<http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/inicio.php>> Acesso em 19 dez 2012.

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

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 4, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M., - **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** ARTMED Editora S.A., 5. ed. São Paulo, 2011.

OKAFOR, U. A. EMEZUE, T. N., OKOCHI, V. I., ONYEGEME-OKERENTA, B. M., NWODO-CHINEDU, S. Xylanase production by *Penicillium chrysogenum* (PCL501) fermented on cellulosic wastes. **African Journal of Biochemistry Research**, vol. 1, n. 4, p. 48-53, 2007.

OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., TAMBOURGI, E.B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, vol. 97, n. 6, p. 862-867, 2006.

OLSSON, L., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 18, p. 312-331, 1996.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCOOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 74, p. 69-80, 2000.

PELIZER, L.H., PONTIERI, M.H., MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, vol. 2, n. 001, p. 118-127, 2007.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** 2. ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research, 1988.187 p.

POLIZELI, M.L.T.M., RIZZATTI, A.C.S., MONTI, R., TERENCE, H.F., JORGE, J.A., AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 67, n.5, p. 577-591, 2005.

PONTÓN, J., MORAGUES M. D., GENÉ, J., GUARRO J., QUINDÓS, G. **Hongos y Actinomicetos Alergênicos**. Revista Ibero Americana de Micologia. 46 p. 2002

POUTANEN, K. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 8, p. 300-306, 1997.

PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 13, p. 100-131, 1995.

PULS, J., BORCHMANN, A., GOTTSCHALK, D., WIEGEL, J. Xylobiose and xylooligomers. **Methods in Enzymology**, vol. 160, p. 528-536, 1988.

RAGHAVENDRA, S.N., RASTOGI, N.K., RAGHAVARAO, K.S.M.S., THARANATHAN, R.N. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. **European Food Research and Technology**, vol. 218, p. 563-567, 2004.

RENGE, V. C., KHEDKAR, S. V., NANDURKAR, N. R. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. **Scientific reviews & Chemical Communications**, vol. 2, n. 4, p. 585-590, 2012.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3a ed. New York: Springer-Verlag, 380 p. 1994.

SHAH, A.R., MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, vol. 40, p. 1763-1771, 2005.

SILVA, R., HARAGUCHI, S.K., MUNIZ, E.C., RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, vol. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SIMÕES, M.L.G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área da caatinga**. 2006. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, São Paulo. 2006

SOUNDARI G., S., SASHI, V. Microbial xylanase: its importante role in various industries. **Aslan Journal of Environmental Science**, vol. 3, n. 2, p. 191-195, 2009.

SUN, J., TIAN, C., DIAMOND, S., GLASS, N. L. Deciphering Transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, vol. 11, n. 4, p. 482-493, 2012.

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bactéria. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 17, n.1, p. 39-67, 1997.

SUURNAKKI, A, CLARK, T.A., ALLISON R.W., VIKARI, L., BUCHERT, J. Xylanase- and mannanase-aided ECF and TCF bleaching. **Tappi Journal**, vol. 79, n. 7, p. 111-117, 1996.

TAMANINI, C., HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. In: **Seminário de Ciências Agrárias**, Londrina. *Anais...* Londrina, vol. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TERRASAN, C.R.F., TEMER, B., DUARTE, M.C.T., CARMONA, E.C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**. vol. 101, p. 4139-4143, 2010.

TIMEL, T.E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Science and Technology**, vol. 1, p. 45-70, 1967.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin**, vol. 13, p. 42-43, 1956.

WHISTLER, R.L., RICHARDS, E.L. Hemicelluloses. In: PIGMAN, W., HORTON, D. The carbohydrates. **Academic Press**, New York, p. 447-469, 1970.

WONG, K.K.Y. AND SADDLER, J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries., In: **Hemicellulose and Hemicellulases**. COUGHLIN, P.P. AND HAZLEWOOD, G.P. eds, p. 127-143. London: Portland Press, 1992.

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. **Topics in Enzyme Fermentation and Biotechnology**, vol. 8, p. 9-30, 1984.

---

YEVICH, R., LOGAN, J. A. An assessment of biofuel use and burning of agricultural waste in the developing world. **Global Biogeochemical Cycles**. Vol. 17, n. 4, p. 1- 42. 2003.

YIN, Y. L., BAIDOO, S.K., SCHULZE, H., SIMMINS, P.H. Effects of supplementing diets containing hullless barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with  $\beta$ -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, vol. 71, p. 97-107, 2001.