

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS POR FUNGO FILAMENTOSO EM
DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

RENATA COLLA

ARARAQUARA – SP

2012

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS POR FUNGO FILAMENTOSO EM
DIFERENTES FONTES DE CARBONO**

Renata Colla

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP
para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica

Orientador: Rubens Monti

Araraquara – 2012

Dedicatória

Dedico este trabalho à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara pela oportunidade de crescimento pessoal e formação profissional que essa faculdade me deu.

Dedico também ao Departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade de iniciação científica concedida.

E principalmente, dedico ao meu orientador Rubens Monti e meu co orientador Caio Casale Aragon, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio que me deram e dedicação que sempre tiveram comigo, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus amigos pelo suporte e motivação nessa etapa final da faculdade.

Agradeço a Unesp Araraquara pela oportunidade de ter vivido os 5 melhores anos da minha vida.

Sumário

Resumo	5
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Introdução	8
Desenvolvimento	11
Conclusão	33
Referências bibliográficas	34

Resumo

O trabalho teve como objetivo principal identificar a produção de enzimas xilanolíticas de um fungo encontrado no solo amazônico a partir do seu crescimento em diferentes fontes de carbono e em dois tipos de meio de cultivo: meio semi sólido e meio líquido Vogel. No meio semi sólido o crescimento do fungo aconteceu durante 7 dias, já no meio líquido foi feito em quatro tempos diferentes: 24, 36, 48 e 52 horas. As fontes de carbono usadas para ambos os meios foram:

Após o crescimento os meios foram filtrados e foram realizadas a dosagem de proteína pelo método de Lowry e a determinação da atividade específica.

Os filtrados foram concentrados através de tratamento com caulin, diálise e precipitação com acetona.

Com os filtrados selecionados pode-se determinar o pH e a temperatura ótimas para a xilanase através de curvas de pH e temperatura.

O fungo estudado produz enzimas do complexo xilanolítico, sendo que os melhores resultados foram encontrados usando a xilana no meio líquido e o sabugo de milho no meio semi sólido.

Para a enzima encontrada o pH de atividade ótima é no valor 5,0 e foram encontrados dois picos de temperaturas ótimas, na faixa de 30°C e 60°C, o que pode indicar a presença de mais de uma enzima do complexo xilanolítico.

Lista de Figuras

Figura 1 ----- Curva de calibração de xilose.

Figura 2 ----- Cromatografia em camada delgada em sílica gel P-60 de amostras retiradas em diferentes tempos de reação. (1) padrão de xilose; (2) 20 minutos; (3) 40 minutos; (4) 60 minutos; (5) 6 horas.

Figura 3 ----- Valores de atividade específica de acordo com a variação de pH do filtrado do meio semi sólido com sabugo de milho como fonte de carbono.

Figura 4 ----- Valores de atividade específica de acordo com a variação de pH do filtrado do meio líquido com xilana como fonte de carbono.

Figura 5 ----- Valores de atividade específica de acordo com a variação de temperatura do filtrado do meio líquido com xilana como fonte de carbono

Figura 6 ----- Valores de atividade específica de acordo com a variação de temperatura do filtrado do meio semi-sólido com sabugo de milho como fonte de carbono

Figura 7 ----- Gel de SDS-PAGE 10% com padrão de massa molecular (1), amostra do extrato bruto obtido do meio semi sólido dialisado com 15 μ L (2) e 20 μ L (3) e do extrato bruto obtido do meio líquido após precipitação com acetona 15 μ L (4) e 20 μ L (5).

Figura 8 ----- Gel de SDS-PAGE 10% corada com prata com padrão de massa molecular (1), extrato bruto obtido do meio semi sólido dialisado com 15 μ L (2) e 20 μ L (3) e do extrato bruto obtido do meio líquido após precipitação com acetona 15 μ L (4) e 20 μ L (5).

Lista de tabelas

Tabela 1 ----- Valores necessários para a curva de calibração de proteína.

Tabela 2 ----- Valores necessários para a curva de calibração de xilose

Tabela 3 ----- Valores de atividade obtidos em crescimento em meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono.

Tabela 4 ----- Valores de atividade obtidos em processos de purificação do meio semi-sólido com sabugo de milho como fontes de carbono.

Tabela 5 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com xilana como fonte de carbono

Tabela 6 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com farelo de trigo como fonte de carbono

Tabela 7 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com avicel como fonte de carbono

Tabela 8 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com sabugo de milho como fonte de carbono

Tabela 9 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com amido como fonte de carbono

Tabela 10 ----- Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono

Tabela 11 ----- Valores de atividade específica após tratamentos de purificação do filtrado de xilana.

1. Introdução

A parede celular de vegetais é formada por celulose, hemiceluloses e pectina que, juntos, formam uma estrutura rígida. As hemiceluloses são um complexo de diversos polissacarídeos e são, depois da celulose, os mais abundantes na biomassa vegetal. A xilana, principal polissacarídeo das hemiceluloses, é uma molécula heterogênea que tem a cadeia principal com ligações β -1,4 de xilose e ramificações de arabinose, ácido metil-glucurônico, grupos acetil, entre outros. As cadeias laterais são de grande importância já que determinam a solubilidade, sua conformação física e a reatividade, influenciando assim, na sua clivagem enzimática. Possui variabilidade química e molecular, dependendo da espécie vegetal na qual é encontrada (POLIZELI et al., 2005). No Brasil existem grandes quantidades de resíduos agrícolas, os quais contêm xilanas e que poderiam ser utilizadas na produção de xilooligossacarídeos (XOS) com aplicações em alimentos e fármacos.

Os fungos são micro-organismos muito estudados atualmente por terem grande importância e aplicabilidade em diversas áreas biotecnológicas e da saúde como produção de alimentos, fármacos, estudos de fungos patogênicos, deteriorização de matéria orgânica, entre outros. Diversos fungos produzem enzimas do complexo xilanolítico, sendo a principal a xilanase, utilizada em diversos processos industriais. Essa aplicação pode ser associada (com a celulase, por exemplo) ou isolada. Para a hidrólise da xilana são necessárias várias enzimas para clivar a cadeia principal e as cadeias laterais. Esse conjunto de enzimas é denominado complexo xilanolítico. O sistema enzimático é composto pelas β -1,4-endoxilanases que clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da

heteroxilana e as β -D-xilosidases que hidrolisam o composto a partir da extremidade não-redutora liberando xilose. As β -1,4-endoxilanases podem ser classificadas de acordo com o produto de sua reação: as que realizam a hidrólise no ponto de ramificação e aquelas que não utilizam esses pontos. A classificação mais completa das xilanases e das glicosidases em geral é feita em famílias que associam estruturas primárias dos domínios catalíticos, mostrando características estruturais e de mecanismos (MONTI et al., 1991; MONTI et al., 2003; GOULART et al., 2005).

O mercado de enzimas tem crescido rapidamente pelo mundo. Estima-se que ele movimentaria anualmente US\$ 2,3 bilhões. No Brasil, em 2005, as importações de enzimas chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões, apesar do grande potencial de produção do país (MUSSATTO et al., 2007).

A principal aplicação das xilanases atualmente é no pré-branqueamento da polpa de celulose na indústria de papéis. Na fase de pré-branqueamento ainda resta lignina residual e as fibras estão escuras. Uma parte da lignina residual pode ser removida de diversas maneiras como hidrólise enzimática, reações de substituição ou adição de oxigênio, resultando em uma pasta amarelada, ainda é imprópria para a fabricação de papéis de qualidade. Já com o branqueamento pode-se obter uma pasta branca e para isso é usado ozônio e dióxido de cloro num primeiro momento, seguido de hidróxido de sódio, oxigênio e peróxido de hidrogênio num segundo estágio e, para finalizar, uma última etapa com dióxido de cloro. O uso do cloro resulta em produtos organoclorados que são extremamente tóxicos e mutagênicos e para serem descartados a indústria precisa realizar vários tratamentos. Como alternativa para isso as xilanases tem sido utilizadas na fase de pré-branqueamento reduzindo o uso de compostos clorídricos. Existem duas hipóteses para o mecanismo de ação das xilanases nesse processo; o primeiro é

que as xilanases eliminam a xilana e com isso a lignina fica livre facilitando a sua remoção. Já a segunda hipótese diz que as xilanases hidrolisam as xilanas que foram precipitadas nas fibras e com isso essas ficam livres e sofrem uma maior ação do ação dos reagentes presentes para seu branqueamento (POLIZELI et al., 2005).

Além das indústrias de papéis, o setor agropecuário também utiliza as enzimas do complexo xilanolítico para a produção de ração animal, já que essas conseguem quebrar as arabinoxilanas deixando o material menos viscoso e melhorando a digestão e absorção dos nutrientes pelo animal (CARVALHO, 2009)

A indústria alimentícia utiliza as xilanases para a panificação, pois estas quando usadas em conjunto com outras enzimas, podem deixar os pães frescos por mais tempo (alfa-amilase e xilanase), aumentar a estabilidade da massa (xilanases e amilase maltogênica) e alterar a elasticidade e a textura do glúten melhorando a cor e o sabor (xilanases e proteases) (MUSSATTO et al., 2007).

Na fabricação de bebidas, as xilanases são utilizadas para a clarificação de sucos e vinhos, liquefação de frutas e mucilagem de café, estabilização da polpa da fruta, recuperação de aromas, redução da viscosidade e hidrólise de substâncias que podem causar o escurecimento ou impedir a clarificação do suco. Para a cerveja o processo é semelhante já que durante a sua fabricação a parede celular da cevada é hidrolisada e isso permite a quebra do amido. Concomitantemente ocorre a liberação de longas cadeias de arabinoxilanas que aumentam a viscosidade do meio e as xilanases auxiliam hidrolisando esses compostos, evitando a turbidez da cerveja (BENEDETTI, 2009).

As beta-xilanases e as xilosidases são importantes enzimas na hidrólise das hemiceluloses e são capazes de produzir xilose, que é um açúcar da classe das pentoses e que, quando fermentado, tem como produtos o etanol e o xilitol. O xilitol,

que tem poder adoçante semelhante ao da sacarose, é indicado para pessoas obesas ou diabéticas. O xilitol usado industrialmente hoje em dia é produzido por catálise química, que é um processo de alto custo e gera produtos tóxicos. O desenvolvimento de novas tecnologias enzimáticas para a produção de xilitol é necessária para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (POLIZELI et al., 2005).

Esses exemplos mostram a importância do estudo e desenvolvimento de técnicas de produção e imobilização de enzimas do complexo xilanolítico para indústrias de alimentos e fármacos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produção de xilanase por um fungo isolado no laboratório de Enzimologia, a partir do solo amazônico (Amazonas).

2.2 Objetivos específicos

- Testar diferentes meios de cultivo para a melhor produção da enzima xilanase em diferentes fontes de carbono.
- Determinar o melhor pH e temperatura de cultivo.
- Clarificar o extrato obtido eliminando possíveis polissacarídeos.
- Determinar pH e temperatura ótimos da atividade xilanolítica.
- Identificar o perfil proteico por meio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida para identificar o perfil proteico do extrato.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Fungo filamentoso isolado de solo amazônico (Amazonas).

3.2 Métodos

Dosagem de proteína

Para a dosagem proteica foi utilizado o método de Lowry (1951), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

Curva de calibração de proteína

Foram utilizadas as seguintes soluções estoque:

- Carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2% em NaOH 0,1M.
- CuSO_4 1%. Essa solução foi preparada no dia do experimento.
- Tartarato de sódio potássico 1%.
- Folin-Ciocalteu diluído 1:1 em água (v/v).
- Soro albumina bovina (BSA) 0,3 mg/mL em água.

Antes de iniciar os experimentos, foi preparada a solução A utilizando a seguinte proporção das soluções estoque:

- Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1N : CuSO_4 1% : Tartarato de sódio potássico 1%
(100:1:1)

No momento da realização das dosagens, foi pipetada primeiramente a água nos tubos e, em seguida, a BSA e a solução A, de acordo com a tabela abaixo. Após agitação, aguardou-se 15 minutos, quando foi adicionado Folin. O tubo foi agitado e, passados 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 660 \text{ nm}$.

Tabela 1 – Valores necessários para a curva de calibração de proteína.

Tubos	Água destilada (mL)	Solução BSA (mL)	BSA (mg)	Solução A (mL)	Folin (mL)
1	0,5	0,00	0	2,5	0,25
2	0,450	0,050	0,015	2,5	0,25
3	0,400	0,100	0,030	2,5	0,25
4	0,350	0,150	0,045	2,5	0,25
5	0,300	0,200	0,060	2,5	0,25
6	0,250	0,250	0,075	2,5	0,25
7	0,200	0,300	0,090	2,5	0,25
8	0,150	0,350	0,105	2,5	0,25

O gráfico foi expresso em “mg de proteína por 0,5 mL” no eixo x e “absorbância em 660 nm” no eixo y, a partir do qual pode-se determinar a inclinação da reta, que corresponde ao coeficiente de extinção ou absortividade.

$A = a \cdot b \cdot c$ (Lei de Lambert-Beer)

A = absorbância

a = absortividade

b = caminho óptico (1 cm)

c = concentração proteica

$$a = A/c$$

Para o cálculo de proteína das amostras aplicou-se o mesmo método e após as leituras de absorbância.

Para os cálculos, dividiu-se o somatório das absorbâncias obtidas pelo valor da absortividade calculada a partir da curva de referência.

$$\Sigma \text{ absorbância} / \text{absortividade} = \text{mg prot} / \Sigma \text{volume}$$

Em seguida, dividiu-se o dado obtido pelo somatório do volume da amostra utilizado na dosagem. Dessa forma, obteve-se o valor de proteína por 1 mL.

Curva de calibração de xilose

Foi preparada uma solução de 1mg/mL de xilose (PM=150,13) em água destilada. A curva foi realizada de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 2 – Valores necessários para a curva de calibração de xilose

Tubos	Xilose (mL)	H2O destilada (mL)	DNS (mL)	Ferver	Esfriar	H2O destilada (mL)	µg xilose	µmols xilose
1	0,000	0,250	0,250	5´	3´	2,5	0	0
2	0,010	0,240	0,250	5´	3´	2,5	10	0,066
3	0,025	0,225	0,250	5´	3´	2,5	25	0,166
4	0,050	0,200	0,250	5´	3´	2,5	50	0,333
5	0,100	0,150	0,250	5´	3´	2,5	100	0,666
6	0,150	0,100	0,250	5´	3´	2,5	150	0,999
7	0,200	0,050	0,250	5´	3´	2,5	200	1,332
8	0,250	0,000	0,250	5´	3´	2,5	250	1,665

Após agitação dos tubos, foi feita a leitura em 540 nm. O gráfico foi construído com “ μ mol de xilose” no eixo x e “absorbância em 540 nm” no eixo y, e a inclinação da reta (coeficiente de extinção molar ou absortividade molar) foi determinada. A unidade do valor encontrado foi útil para a determinação da quantidade de açúcar redutor (xilose) em amostras desconhecidas. Para o cálculo da atividade enzimática onde o produto da reação foi um açúcar redutor, fez-se o ensaio e retirar amostras em diferentes tempos e usar o DNS nas mesmas condições de calibração.

Ensaio enzimático

Para cada ensaio foi pesado 57 mg de xilana, e adicionado 4 mL tampão acetato sódio 50 mM pH 5,0. O erlenmeyer foi colocado no banho a 35°C com agitação. Em seguida foi adicionado 1 mL da amostra (enzima) e retirado 0,250 mL no tempo de 0 minuto para o ensaio em branco e depois nos tempos 10, 20 e 30 minutos.

Em cada tubo foi adicionado 0,250 mL de DNS, aquecendo em água fervente por 5 minutos e esfriado em água corrente. Foram adicionados 2,5 mL de água em cada tubo e, após agitação, foi feita a leitura no espectrofotômetro em 540 nm. Após fazer as leituras de absorbância foram feitos os cálculos de somatório das absorbâncias dividindo-a pelo somatório do tempo em questão, obtendo-se um valor de A/min:

$$\Sigma \text{abs} / \Sigma \text{tempo} = A/\text{min}$$

O valor pela absortividade molar (ϵ) foi dividido pelo valor encontrado e obteve-se o número de μ mol de açúcar redutor formado por minuto.

$$A/\text{min} / \epsilon = \mu\text{mol açúcar redutor por minuto}$$

Multiplicou-se esse valor obtido pelo volume total do ensaio e esse foi dividido pelo volume de enzima utilizado, assim obteve-se a atividade expressa em unidades internacionais (UI).

$$\mu\text{mols min} \times \text{volume ensaio/volume enzima} = \mu\text{mols/min/mL enzima (UI)}$$

Finalmente, dividindo-se o valor da atividade em UI pela quantidade de proteína expressa em mg/mL tem-se a atividade específica ($\mu\text{mols/min mg}$ proteína).

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \text{atividade (U/mL)} / \text{concentração proteica (mg/mL)}.$$

Manutenção de micro-organismos e produção de conídios

O meio de cultura para o fungo foi feito em base de ágar (2%) e aveia (4%). São preparados diversos tubos, cada um contendo 12 ml de meio de cultura (MONTI, 1989). O meio foi aquecido em banho-maria (100°C) por 15 minutos até homogeneização e, em seguida, foi distribuído em tubos de ensaio, tampando-os com algodão. Para esterilizar o meio, este foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

A partir de um tubo de cultivo do fungo foi feito o repique para meios inclinados novos. Esse procedimento foi realizado na capela previamente esterilizada com algodão e álcool 70% e UV por 20 minutos. O repique foi feito com alça esterilizada com cuidado para não perfurar o meio na coleta dos esporos e na passagem para o novo tubo.

Produção de xilanase

Foram utilizadas diferentes fontes de carbono para produção das enzimas xilanolíticas, entre elas: farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana, avicel, amido e xilana.

Meio semi-sólido

Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 2,5 g de fonte de carbono, 4 mL de água destilada e 1 mL de água de milho.

Após o crescimento, foi adicionado um pouco de água no meio e essa foi misturada no meio de cultivo com uma bagueta de vidro, auxiliando o meio a se soltar do frasco. Em seguida, o meio foi filtrado a vácuo com um funil de Buchner e o sobrenadante armazenado num frasco e congelado.

Meio Vogel

Foram preparados, em erlenmeyers de 250 mL, o Vogel com a seguinte composição, num total de 50 mL em cada frasco:

- solução estoque de sais(g/L): citrato de sódio duplo hidratado (161), KH_2PO_4 (322), NH_4NO_3 (129), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (13), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6,5)
- solução de elementos traços: 6,5 mL

O pH do meio foi ajustado em 6,0. Após o tempo determinado para crescimento, o meio foi filtrado num funil de Buchner e o sobrenadante armazenado em frasco e congelado.

SDS-PAGE

A eletroforese em condições desnaturantes será realizada em gel de poliacrilamida-SDS, de acordo com método de Laemmli (1970), usando-se acrilamida a 10% e um padrão de massa molecular (GE Healthcare Life Sciences) contendo fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) and α -

lactoalbumina (14,4 kDa). As bandas protéicas foram visualizadas com corante Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate (Sigma®) ou por prata, como descrito por Heukeshoven (1985).

Cromatografia em camada delgada (TLC)

Os produtos de hidrólise da xilana foram analisados por cromatografia em camada delgada em silica gel G-60, utilizando-se acetato de etila: ácido acético: ácido formico: água (9:3:1:4 v/v) como fase móvel, de acordo com Fontana (1988). Os açúcares foram detectados com 0,2% de orcinol em ácido sulfúrico-metanol, e xilose foi utilizado como padrão.

Determinação do pH ótimo

Para se determinar o pH ótimo da enzima foi feita uma curva de pH usando o tampão McIlvaine como tampão padrão para o experimento. A atividade enzimática foi dosada em banho com temperatura de 35°C e em valores de pH 3,4,5,6,7 e 8.

Determinação de temperatura ótima

A partir do pH ótimo pode-se determinar a temperatura ótima para a enzima. A curva de temperatura foi feita com o banho em 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C e 70°C.

Com os dados obtidos elaborou-se um gráfico onde se pode observar a temperatura ótima da enzima.

4. Resultados

Curva de calibração de xilose

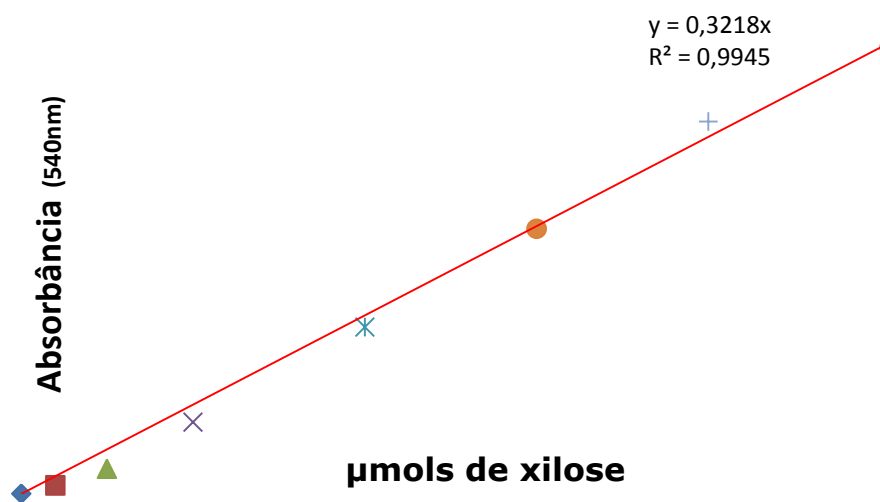


Figura 1 – Curva de calibração de xilose.

A Figura 1 representa os dados obtidos com diferentes concentrações de xilose. O coeficiente de extinção molar obtido foi de $0,3218 (\mu\text{mol}/0,25\text{mL})^{-1} \text{cm}^{-1}$, ou $80,45 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Meio Semi-sólido

Os cultivos de meio semi sólido foram realizados em erlenmeyer de 250mL, variando a fonte de carbono de acordo com a tabela abaixo. O crescimento foi realizado em temperatura ambiente (de 27°C a 30°C) durante 14 dias. Após esse período adicionou-se tampão acetato em volume suficiente para que o meio se

tornasse pastoso e este foi deixando overnight em agitação e, filtrado a vácuo em seguida.

A partir desse filtrado realizou-se a dosagem proteica pelo método de Lowry e determinação da atividade enzimática. Os resultados obtidos se encontram na tabela.

Tabela 3 – Valores de atividade obtidos em crescimento em meio semi-sólido com diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Xilana	7,368	0,038
Sabugo de milho	3,414	0,050
Bagaço de cana	1,962	0,006
Farelo de trigo	3,227	0,011
Amido	4,066	0,000
Avicel	2,066	0,000

Pela tabela 3 foi observado que baixas atividades específicas foram obtidas em meio semi-sólido, e quando se utilizaram amido e avicel como fonte de carbono não se verificou atividade xilanolítica.

A partir dos resultados obtidos pode-se selecionar o filtrado do meio de cultivo em que o fungo teve maior atividade específica para o processo de purificação. O meio selecionado teve como fonte de carbono o sabugo de milho.

Sabugo de milho

O filtrado do meio sólido com fonte de carbono de sabugo de milho foi tratado com caulim para purificação parcial por floculação seletiva. Utilizou-se 40mg de caulim para cada 1mL de amostra. Para que o tratamento fosse mais efetivo a amostra foi deixada em contato com o caulim *overnight* e mantida em geladeira.

Após esse período a amostra foi centrifugada para que o caulim fosse separado e em seguida realizou-se a dosagem proteica pelo método de Lowry e determinação da atividade específica.

A amostra tratada com caulim foi dialisada em câmara fria, com agitação constante durante 24h e com 2 trocas da água do processo. Após esse período a amostra foi retirada da diálise e determinação da atividade enzimática.

Em seguida, realizou-se a precipitação com acetona e ressuspensão em água, concentrando a amostra em 6 vezes. Para isso utilizou-se 6mL de amostra para 18mL de acetona, mantendo o frasco no freezer overnight. Após esse tempo a amostra foi centrifugada por 20 minutos em 9000 rpm a 4°C e sobrenadante foi descartado. Após a secagem do frasco adicionou-se 1mL de água e com o auxílio de uma bagueta de vidro o precipitado foi suspenso em água. Com essa nova amostra fez-se uma dosagem proteica pelo método de Lowry e uma cinética enzimática de determinação da atividade específica.

Tabela 4 – Valores de atividade obtidos em processos de purificação do meio semi-sólido com sabugo de milho como fontes de carbono.

Tratamentos	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Sem tratamento	3,414	0,050
Tratamento com Caulim	4,420	0,087
Diálise	1,753	0,199
Precipitação com acetona	4,409	0,092

Em continuação do experimento o filtrado foi tratado e purificado para que as impurezas presentes fossem eliminadas e não interferissem no resultado final da pesquisa. A cada etapa de purificação foi realizada uma dosagem proteica e uma cinética enzimática para que se pudesse observar a efetividade do processo.

Pelos experimentos da tabela 4, pode-se notar que a precipitação com acetona não foi efetiva na concentração da enzima xilanase e por isso a amostra após esse processo não foi utilizada para a continuação da pesquisa e sim a resultante da diálise, com maior atividade específica.

Em seguida foi feita uma cinética enzimática longa, com amostras colhidas nos tempos de 20, 40, 60 minutos e após 6 horas após o início da mesma.

Com essas amostras foi feita uma cromatografia em camada delgada.

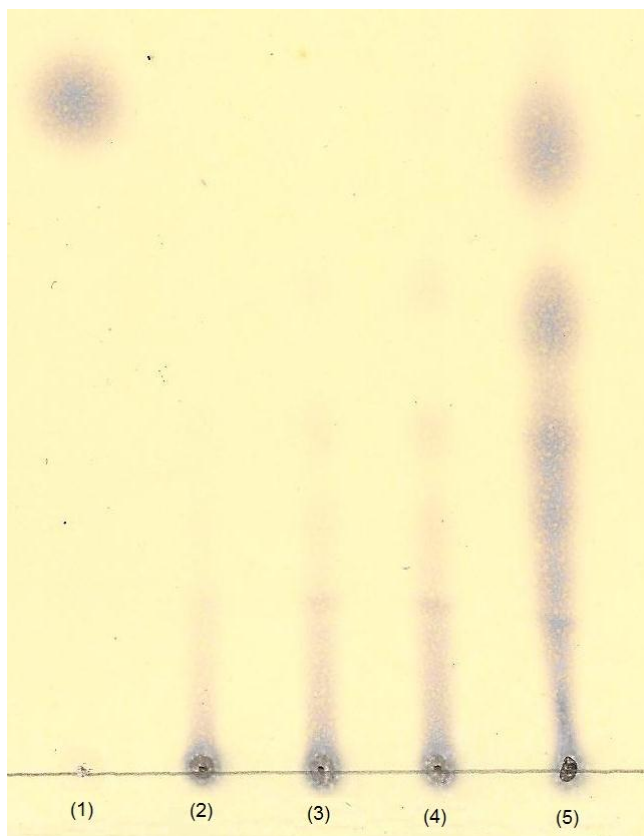


Figura 2 – Cromatografia em camada delgada em sílica gel P-60 de amostras retiradas em diferentes tempos de reação. (1) padrão de xilose; (2) 20 minutos; (3) 40 minutos; (4) 60 minutos; (5) 6 horas.

Pode-se concluir pela figura 2 que a enzima xilanase está degradando o açúcar e a enzima está concentrada e presente no filtrado já que quanto maior o tempo de exposição da xilana ao filtrado maior é a degradação da mesma em diversos oligossacarídeos.

Meio líquido

A princípio o meio líquido utilizado teria como composição CaCO_3 0,1%, NaCl 0,5%, NH_4Cl 0,1%, água de maceração de milho 0,5%, água para completar volume para 50mL e fonte de carbono 1% (item 3.2.5) com o pH ajustado para 6,0. Porém o

crescimento observado do fungo era muito baixo o que dificultava os experimentos e por isso o meio líquido acima foi trocado pelo meio Vogel, no qual os resultados obtidos foram melhores.

O crescimento em meio líquido foi realizado em diferentes tempos, sob agitação constante e temperatura de 35°C. Para cada fonte de carbono foram preparados 4 meios de cultivo os quais foram inoculados filtrados à vácuo nos tempos de 24h, 48h, 52h e 72 horas. A partir desses filtrados foram realizadas a dosagem proteica pelo método de Lowry e determinação da atividade específica.

Os resultados obtidos para cada fonte de carbono estão separados nas tabelas seguintes:

Tabela 5 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com xilana como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,3	0,000
48h	0,319	1,576
52h	0,334	1,443
72h	0,371	1,368

Tabela 6 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com farelo de trigo como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,909	0,000
48h	1,018	1,443
52h	0,370	1,022
72h	0,357	0,560

Tabela 7 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com avicel como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,096	0,000
48h	0,468	0,000
52h	0,309	0,032
72h	0,421	0,022

Tabela 8 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com sabugo de milho como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,612	0,000
48h	0,398	0,138
52h	0,427	0,374
72h	0,557	0,096

Tabela 9 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com amido como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,011	0,000
48h	0,182	0,456
52h	0,228	0,387
72h	0,166	0,168

Tabela 10 – Valores de atividade obtidos no crescimento em diferentes tempos com bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono

Tempo (horas)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
24h	0,3102	0,000
48h	0,370	0,062
52h	0,278	0,138
72h	0,309	0,015

Pode-se observar que mesmo com os diferentes valores de atividade específica em todos os extratos das variadas fontes de carbono a maior atividade específica aconteceu entre 48h e 52h, sendo que melhores atividades foram obtidas quando se utilizou xilana ou farelo de trigo como fontes de carbono.

A partir desses resultados foi selecionado o filtrado com maior atividade para o processo de purificação. O meio de cultivo escolhido foi aquele em que a xilana foi usada como fonte de carbono.

Tabela 11 – Valores de atividade específica após tratamentos concentração do filtrado de xilana.

Concentração	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Extrato bruto	0,326	1,501
Diálise	0,098	3,831
Precipitação com acetona	0,470	5,310

Como o meio utilizado foi o meio Vogel não foi necessária a etapa de precipitação seletiva com o caulim já que o meio não possui muitas impurezas sólidas. Foi realizada uma diálise na qual a amostra foi deixada *overnight* com agitação constante e a água do experimento foi trocada duas vezes nesse período. Em seguida fez-se uma dosagem proteica e determinação da atividade enzimática.

Para concentrar a enzima fez-se em seguida uma precipitação com acetona e sua ressuspensão em água, concentrando a amostra em 6 vezes. Para isso usou-se 18mL de acetona para cada 6mL da amostra, deixando *overnight* no freezer para que em seguida os frascos fossem centrifugados por 20 minutos a 9000 rpm na temperatura de 4°C, e após a secagem destes o precipitado fosse ressuspenso em 1mL de água. Para verificar a efetividade do processo foi realizada a dosagem protéica e a determinação da atividade enzimática.

A partir desses resultados pode-se observar que os métodos de concentração do extrato foram efetivos para a concentração da enzima.

pH ótimo de atividade

Após a definição das melhores fontes de carbono para o crescimento do fungo e desenvolvimento de xilanase foi feita uma curva de pH para definir qual é o melhor pH de atividade da enzima.

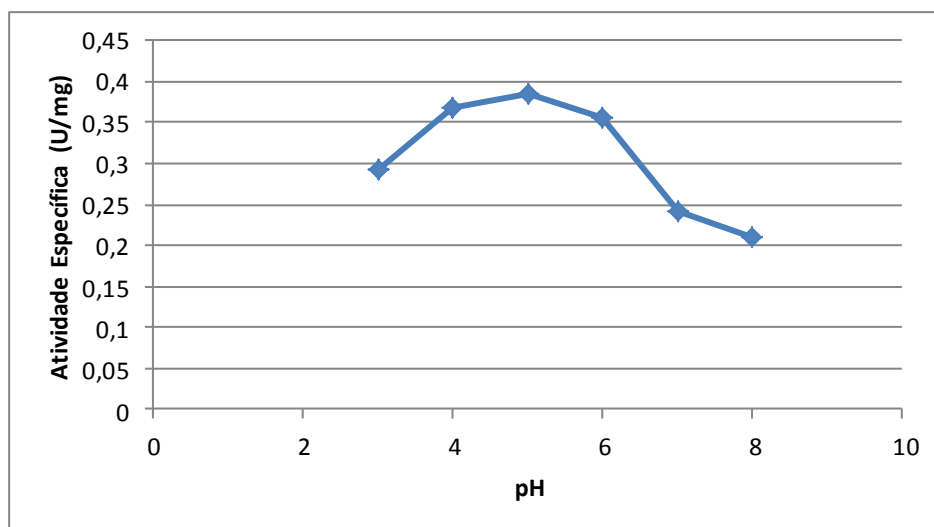


Figura 3 – Valores de atividade específica de acordo com a variação de pH do filtrado do meio semi sólido com sabugo de milho como fonte de carbono.

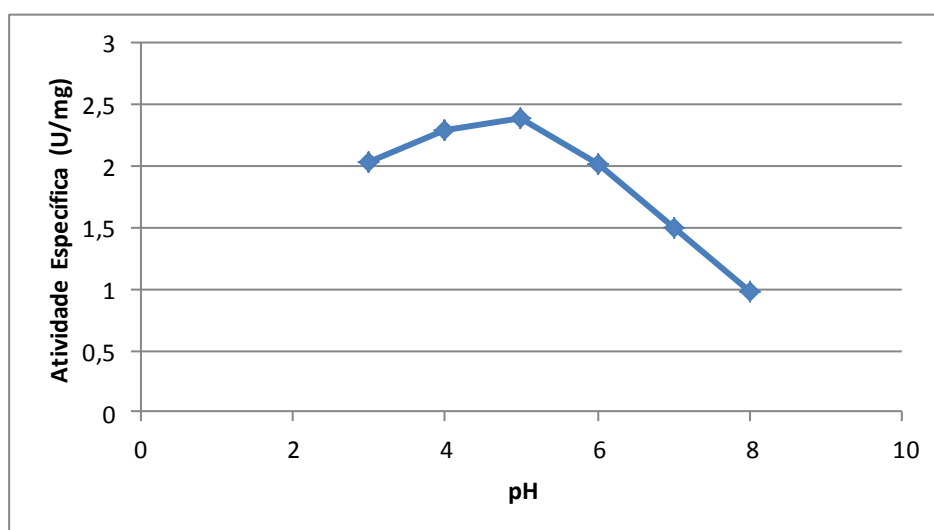


Figura 4 – Valores de atividade específica de acordo com a variação de pH do filtrado do meio líquido com xilana como fonte de carbono.

Pelas figuras pode-se observar que o pH ótimo para a enzima dentre os testados é o de valor 5,0.

Temperatura ótima de atividade

Após a definição do pH ótimo da enzima xilanase realizou-se uma curva de temperatura para que a temperatura ótima do ensaio fosse determinada.

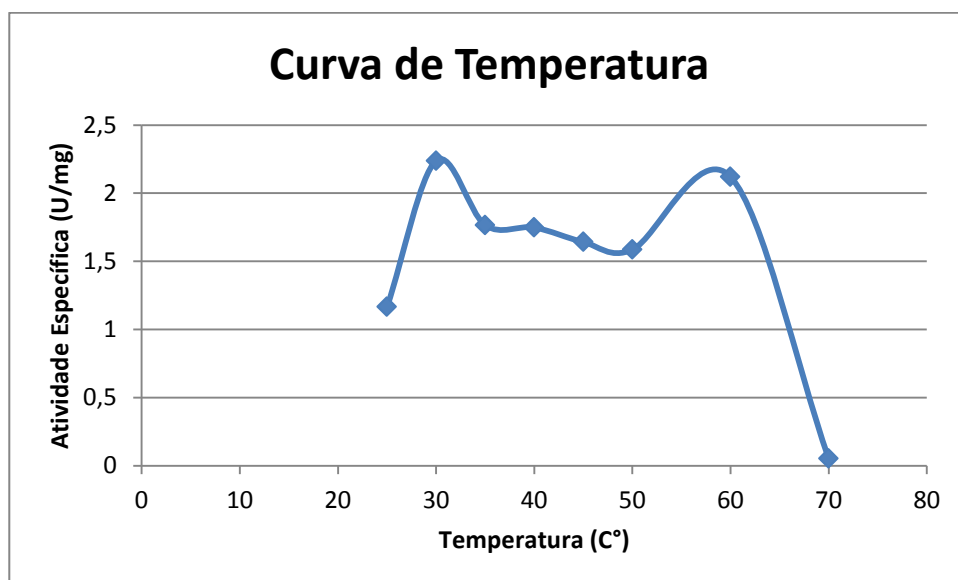


Figura 5 – Valores de atividade específica de acordo com a variação de temperatura do filtrado do meio líquido com xilana como fonte de carbono

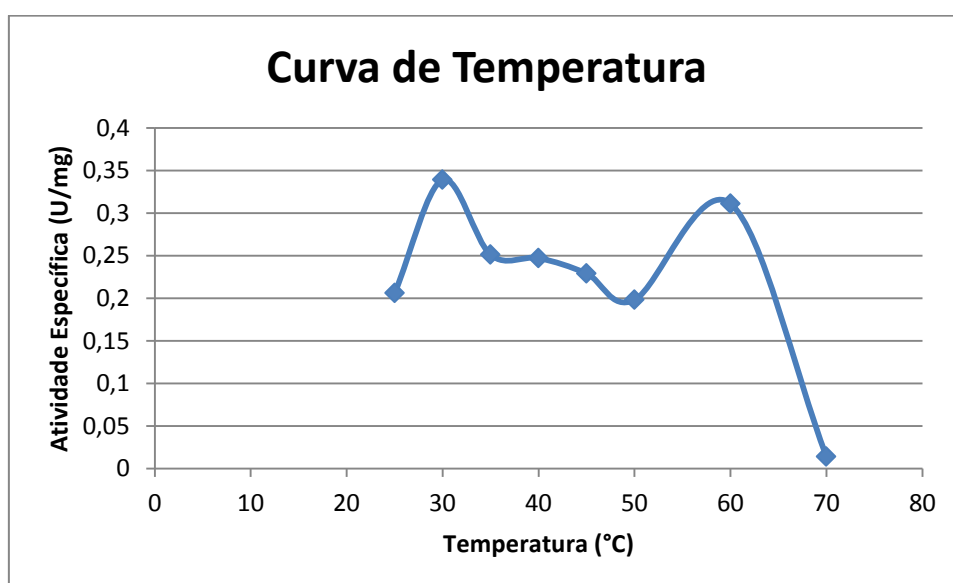


Figura 6 – Valores de atividade específica de acordo com a variação de temperatura do filtrado do meio semi-sólido com sabugo de milho como fonte de carbono

Pelos gráficos pode-se observar que foram encontrados dois picos de temperatura ótima, na faixa de 30°C e 60°C. Como os dois picos se repetiram na mesma faixa de temperatura nos dois gráficos pode-se supor que o fungo estudado produz mais de uma variação de xilanase. Alguns casos já citados na literatura referem múltiplas formas de enzima xilanases, as quais possuem temperaturas ótimas distintas.

As xilanases podem ter temperaturas ótimas distintas dependendo do microorganismo que as produz, podendo chegar até 70°C para alguns fungos como *Thermomyces lanuginosus*, *Scytalidium thermophilum*, *Melanocarpus albomyces* e *Chaetomium thermophile* entre outros (GOMES, 2007).

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

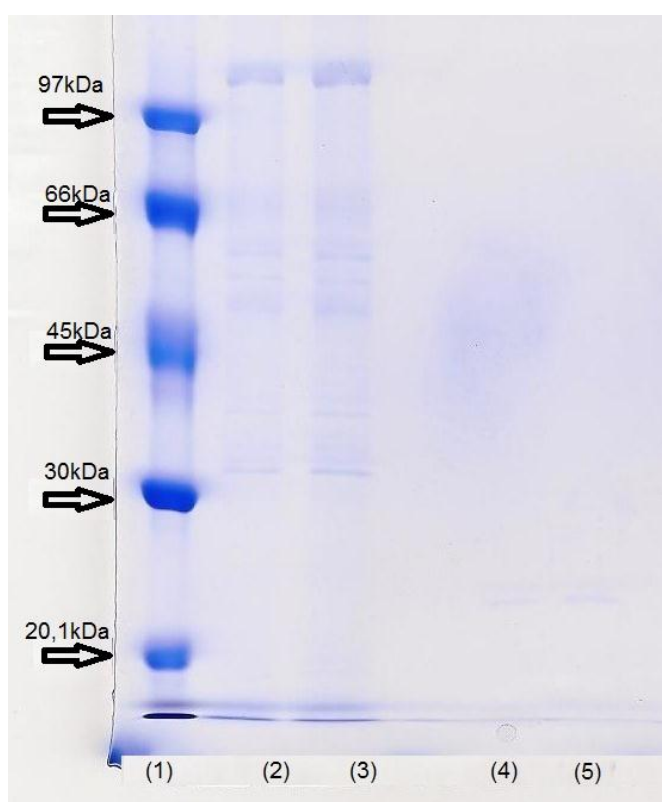


Figura 7 – Gel de SDS-PAGE 10% com padrão de massa molecular (1), amostra do extrato bruto obtido do meio semi sólido dialisado com 15µL (2) e 20 µL (3) e do

extrato bruto obtido do meio líquido após precipitação com acetona 15 μ L (4) e 20 μ L (5).

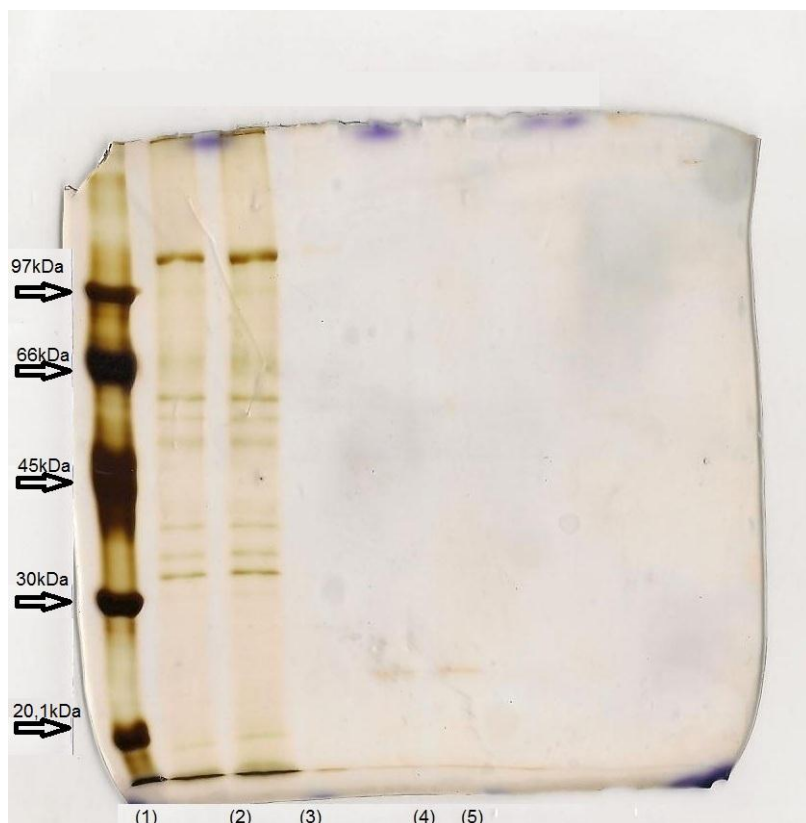


Figura 8 – Gel de SDS-PAGE 10% corado com prata com padrão de massa molecular (1), extrato bruto obtido do meio semi sólido dialisado com 15 μ L (2) e 20 μ L (3) e do extrato bruto obtido do meio líquido após precipitação com acetona 15 μ L (4) e 20 μ L (5).

Não foi possível visualizar as bandas do meio líquido na figura 7, com o corante coomassie blue, e por isso a placa, em seguida, foi corada em prata para que a visualização fosse possível, demonstrada na figura 8.

Na figura 8 pode-se ver as mesmas bandas do meio semi-sólido e apenas uma banda em cada amostra do meio líquido. Com isso podemos observar que na amostra do meio líquido consegue-se detectar proteínas somente de uma faixa de peso molecular. A faixa vista na coloração em prata é de aproximadamente 23kDa.

Já nas amostras do meio semi sólido foram encontradas diversas bandas de pesos moleculares diferentes.

Esse experimento comprova os dados dos anteriores que indicavam que os extratos dos meios semi sólido tinha uma maior atividade proteica porém uma menor atividade específica indicando impurezas, como outras proteínas. Já os extratos dos meios líquido possuem uma maior atividade específica e uma menor atividade proteica, ou seja, uma maior purificação para a xilanase.

5. Conclusão

Com os testes realizados pode-se concluir que o fungo encontrado no solo amazônico produz enzimas xilanolíticas e que este tem uma atividade melhor em meios líquidos. Além disso o crescimento no meio líquido é muito mais rápido do que no meio semi sólido.

A melhor fonte de carbono para o meio semi sólido é o sabugo de milho, já para o meio líquido a melhor fonte é a xilana.

Para a enzima encontrada o pH ótimo é em torno de 5,0 e foram encontrados dois picos distintos de temperatura ótima (30°C e 70°C) o que indica que o fungo produz enzimas diferentes do complexo xilanolítico.

Uma próxima etapa é a identificação do fungo e a determinação de quais enzimas do complexo xilanolítico são produzidas pelo fungo.

6. Referências bibliográficas

Benedetti, A.C.E.P. **Isolamento de fungo produtores de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase**. 2009. 110f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

Carvalho, J.C.C.; Bertechini, A.G.; Fassani, E.J; Rodrigues, P.B.; Pereira, R.A.N. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementados com complexos enzimáticos. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.2, p.292-298, 2009

Davis, B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.121, p.404-427, 1964.

Fontana, J. D.; Gebara, M.; Blumel, M.; Schneider, H.; Mackenzie, C. R.; Johnson, K. G. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.**, v.60, p.560-571, 1988.

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

Gomes, E.; Guez, M.A.U.; Martin N.; Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007.

Heukeshoven, J., Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, v.6, p.103-112, 1985.

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

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951

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

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

Monti, R.; Cardello, L.; Custódio, M.F.; Goulart, A.J.; Sayama, A.H.; Contiero, J. Production and Purification of an endo-1-4- β -xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* by electroelution. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, p. 124-128, 2003

Mussatto, S.I., Fernandes, M.; Milagres A.M.F. Enzimas poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, nº. 242, p. 28-33, 2007.

Polizelli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J.; Amorim, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl. **Microbiol. Biotechnol.** (Mini-Review), v. 67, n.5, p. 577-591, 2005.