

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação,
caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de
pseudocaule de bananeira frutífera**

Lígia Aíra de Medeiros

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada

Piracicaba

2007

Lígia Aíra de Medeiros
Engenheiro Agrônomo

Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera

Orientadora:

Profa. Dra. **SILVIA MARIA GUERRA MOLINA**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor
em Ecologia Aplicada

Piracicaba

2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Medeiros, Lígia Aíra de

Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera / Lígia Aíra de Medeiros. - - Piracicaba, 2007.

124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Banana 2. Branqueamento 3. Enzimas 4. Penicillium 5. Polpa de celulose
6. Purificação 7. Resíduos agrícolas I. Título

CDD 634.772

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

OFEREÇO

Aos meus pais, Luiz Carlos e Audenir Aurélia e à minha avó Aparecida pelo incentivo, dedicação e compreensão pelos muitos momentos de ausência.

Ao meu noivo, Cassio Mitsuki pelo carinho e apoio nas horas mais importantes da minha vida.

À minha irmã Nara Ísis (*in memorian*) e ao meu avô João Theodoro de Medeiros (*in memorian*), por tudo que me ensinaram.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Maria Guerra Molina, pela orientação e por tudo que me ensinou desde minha iniciação científica, por sua confiança, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo e ao Prof. Dr. Francides Gomes da Silva Júnior pelas sugestões e oportunidade de desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Salete A. Gaziola, pelas importantes sugestões, as quais contribuíram enormemente para o desenvolvimento desse trabalho, pelo apoio, paciência e amizade.

A todos do laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (ESALQ-USP), pelo apoio e amizade. Em especial, ao Dr. Renato Ferreira, pela colaboração nos experimentos iniciais de purificação.

À Fabiana Gomes, Fernanda S. Antunes, Fava (Mari Gomes) e a todos do laboratório de Química, Celulose e Energia (ESALQ-USP), pelo apoio nos experimentos de polpação e pela agradável convivência. À Fernanda Gomes, pelas fotos do processo de polpação.

Ao Departamento de Genética (ESALQ-USP) pelo espaço concedido e aos funcionários Sr. Marcos Gorga e José Carmesini pela colaboração.

Aos amigos, Maurício Massao Yamada (Otxá), Luana F. Erlo e Ana Paula de S. Pallu, pela amizade que construímos nos anos de convivência no laboratório e que nos acompanhou pelos diferentes caminhos que seguimos. Lembrarei com muito carinho de todas as conversas, desabafos e momentos de descontração.

A todos os amigos que fiz durante o curso de pós-graduação, em especial à Ana Paula Branco do Nascimento, Andréa Guelfi, Cláudia Coelho dos Santos, Gabriel Lui, Jorge Henrique da Silva, Júlia Salvador Martins, Márcia Regina da Silva e Sônia Guilmo, pela agradável convivência e pelas várias horas de conversa.

A todos estagiários de iniciação científica, que estão ou já passaram pelo laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais e Ecologia Humana, em especial ao Maurício Massao Yamada, Ivanilda Alves da Silva, Marcos P. Monteiro de Oliveira, Pedro Michelin, Bruno Rógora Kawano, Felipe Tostes de Paula, Vanessa Zambom Siqueira e Diogo Carneiro Melo, pela amizade, colaboração e por terem, com suas dúvidas, me ensinado muitas coisas.

Aos meus sogros Sérgio (*in memorian*) e Teresinha Mitsuki, aos meus cunhados Ilka, Reinaldo, Marli e André, ao tio Jorge Mitsuki, ao tio Cláudio, à tia Darci, à Nice, à minha sobrinha Camila, ao meu irmão Augusto e à minha irmã Aline, pelo carinho.

À minha querida amiga Roselane Biangaman de Matos, por sempre estar disposta a me ouvir e me ajudar, por todo seu carinho e confiança.

À Sra. Regina Freitas, secretária do PPGI-Ecologia Aplicada, por todo seu carinho, confiança e atenção.

Aos funcionários do Serviço de Pós-Graduação e aos da Biblioteca Central e Bibliotecas Setoriais, pelo profissionalismo e contribuições a esse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado e de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

“A consciência do mundo e a consciência de si como ser inacabado necessariamente inscrevem o ser consciente de sua inconclusão num permanente movimento de busca (...)”

Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Cultura da Bananeira	20
3.1.1 Resíduos da bananeira	21
3.2 A xilana e sua hidrólise	22
3.3 Sistema xilanolítico	25
3.4 Aplicações das Xilanases	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Meios de Cultura e Soluções	36
4.2 Microrganismos	39
4.3 Resíduos Agroindustriais.....	39
4.4 Condições de cultivo para produção enzimática	39
4.5 Efeito do meio de cultivo sobre a produção de xilanase	40
4.6 Efeito do uso de resíduos agroindustriais com fonte de carbono sobre a produção de xilanase	40
4.7 Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de xilanase	40
4.8 Efeito de diferentes carboidratos sobre a produção de xilanase.....	41
4.9 Determinação da massa micelial	41
4.10 Determinação da atividade de xilanase	41
4.11 Determinação da atividade de celulasas.....	42
4.12 Determinação de proteína total.....	42
4.13 Purificação das xilanases.....	42
4.14 Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular.....	43

4.15 Eletroforese (em sistema desnaturante e em sistema não-desnaturante).....	44
4.16 Determinação do pH e da temperatura ótima de reação.....	44
4.17 Determinação da estabilidade em diferentes valores de pH.....	44
4.18 Determinação da estabilidade térmica.....	45
4.19 Efeito de íons metálicos e reagentes na atividade de xilanase.....	45
4.20 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$).....	45
4.21 Determinação de açúcares neutros.....	46
4.22 Obtenção e preparo do pseudocaule da bananeira.....	46
4.23 Pré-hidrólise do pseudocaule da bananeira.....	46
4.24 Polpação kraft.....	47
4.25 Determinação do número Kappa.....	47
4.26 Tratamento enzimático da polpa de pseudocaule de bananeira.....	48
4.27 Delineamento experimental e análise dos resultados.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Efeito da linhagem, meio de cultivo e tempo sobre a produção de xilanase.....	49
5.2 Efeito do uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono e do tempo sobre a produção de xilanase.....	55
5.3 Efeito de diferentes carboidratos na atividade de xilanase e biomassa micelial.....	58
5.4 Purificação das xilanases.....	66
5.5 pH ótimo de reação.....	82
5.6 Temperatura ótima de reação.....	83
5.7 Estabilidade em diferentes pHs.....	84
5.8 Estabilidade térmica.....	85
5.9 Efeito de íons metálicos e reagentes na atividade de xilanase.....	89
5.10 Parâmetros cinéticos.....	93
5.11 Polpação do pseudocaule da bananeira.....	96
5.12 Efeito das xilanases purificadas e do complexo xilanolítico na liberação de cromóforos e açúcares redutores da polpa de pseudocaule de bananeira.....	100
6 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	112

RESUMO

Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera

O objetivo desse trabalho foi estudar o potencial de xilanases presentes no filtrado de cultura e de xilanases purificadas de *Penicillium chrysogenum* no processo de branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeiras frutíferas. Inicialmente, estabeleceu-se o meio e o tempo de cultivo ótimos para a produção de xilanase pelas linhagens IFO-4626 e M-85 de *Penicillium chrysogenum*. Ambas as linhagens apresentam, além da alta atividade de xilanase, alta atividade de pectinases e baixa atividade de celulases, características que contribuem para seu emprego no processamento de polpa e(ou) fibras celulósicas. Para a linhagem IFO-4626, a melhor produção de xilanase foi obtida no meio Ferreira após 60h de cultivo, usando como indutor xilana de *oat spelt*. O desempenho da linhagem M-85 só se iguala ao da IFO-4626 no tempo 72h, no meio Haas. Como fontes de carbono, palha de cana-de-açúcar e fibra de coco podem substituir a xilana de *oat spelt* na produção de xilanase pela linhagem IFO-4626. Xilose pode induzir a síntese de xilanase quando nenhuma fonte de xilana é adicionada ao meio. A inibição da atividade de xilanase foi observada nos meios com xilana e glicose (1%) ou galactose (1%). Nos experimentos de purificação da xilanase foi usado o filtrado de cultura obtido após 72h de cultivo da linhagem IFO-4626 no meio Ferreira. Dois picos com atividade de xilanase foram obtidos após a eluição em uma coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel. A xilanase I, com massa molecular de 12,6 kDa, $K_m = 12,14 \text{ mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 7,75 \text{ U}/\mu\text{g}$ de proteína, não se ligou à resina e a xilanase II, com massa molecular de 20 kDa, $K_m = 39,32 \text{ mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 1579,62 \text{ mg/mL}$, foi eluída com 100 mM de NaCl. Tanto as xilanases presentes no filtrado de cultura como as xilanases I e II, apresentaram boa estabilidade térmica a 40°C e 50°C e em valores de pH de 3,5 a 9,0. Porém, além de não possuírem boa estabilidade a 60°C, suas temperaturas e pH ótimos de reação são baixos. As xilanases presentes no filtrado de cultura foram ativadas pela presença de Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} e ditioneitol (DTT) e inibidas pela presença de Zn^{+2} , dodecil sulfato de sódio (SDS), Pb^{+2} e Hg^{+2} . A atividade da xilanase I foi estimulada por DTT, Ca^{+2} e Mn^{+2} e inibidas por Cu^{+2} , Zn^{+2} , SDS e Hg^{+2} . Já a xilanase II foi inibida por Hg^{+2} e ativada por diversos íons: Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} e por NH_4^+ e DTT. As xilanases presentes no

filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 e as xilanases purificadas I e II favoreceram a liberação de cromóforos a 237nm e de açúcares redutores. Porém, as enzimas presentes no filtrado de cultura mostraram-se mais adequadas para liberação de cromóforos com absorção em diferentes comprimentos de onda. Ou seja, constatou-se que as enzimas presentes no filtrado de cultura possuem melhor potencial do que as xilanases purificadas I e II, para favorecer o posterior branqueamento da polpa kraft de pseudocaulis de bananeiras frutíferas.

Palavras-chave: *Penicillium chrysogenum*; Xilanase; Purificação de enzimas; Branqueamento enzimático; Cromóforos

ABSTRACT

Xylanases from *Penicillium chrysogenum*: production, purification, characterization, and their application to pre-bleaching cellulosic pulp of banana tree

The aim of this work was to study the potential of xylanases present in culture filtrate of *Penicillium chrysogenum* and of this xylanases purified in favor of the pre-bleaching of pseudo-stem cellulosic pulp of banana trees. Early, it was established the optimal media and time of culture to production of xylanases by IFO-4626 and M-85 *Penicillium chrysogenum* strains. Both strains have presented such characteristics as to contribute to their use in pulp and/or cellulosic fibers industrial process, besides the high activity of pectinases and the low activity of cellulases. To the IFO-4626 strain, the best production of xylanases using as inductor oat spelt xylan was obtained in the Ferreira medium, after 60h of culture. The performance of M-85 strain only was equal to that at the 72 hours in the Haas medium. As carbon sources, both sugar-cane straw and coconut fiber can substitute the oat spelt xylan in the production of xylanase by IFO-4626 strain. Xylose can induce the synthesis of xylanase when no xylan source was added to the culture medium. The inhibition of activity of xylanase was observed in medium with xylan plus glucose (1%) or galactose (1%). In the essays about xylanase purification, it was used the culture filtrate of IFO-4626 strain, obtained after 72 hours of culture in Ferreira medium. Two peaks with xylanase activity were obtained after the elution in an anionic-exchange column DEAE-Sephacel. The xylanase I, showed molecular mass of 12.6 kDa, $K_m = 12.14 \text{ mg/mL}$ and $V_{max} = 7.75 \text{ U}/\mu\text{g}$ of protein, and it was not bind to the resin, and the xylanase II, with molecular mass of 20 kDa, $K_m = 39.32 \text{ mg/mL}$ and $V_{m\acute{a}x} = 1579.62 \text{ mg/mL}$, was eluted with NaCl 100 mM. The xylanases in the culture filtrate, and the xylanases I and II, have presented good stability at 40°C and 50°C, and in pH values 3.5 to 9.0, despite of having no good stability at 60°C, their optimal temperatures and pH of reaction are low. The xylanases present in culture filtrate were activated by the presence of Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} and dithiothreitol (DTT) and inhibited by the presence of Zn^{+2} , sodium dodecyl sulphate (SDS), Pb^{+2} and Hg^{+2} . The xylanase I activity was stimulated by DTT, Ca^{+2} , and Mn^{+2} , and inhibited by Cu^{+2} , Zn^{+2} , SDS, and Hg^{+2} . On the other hand, the xylanase II was inibited by Hg^{+2} , and it was activated by several ions, like as: Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , and by NH_4^+ and DTT. The xylanases from IFO-4626 strain, present in

the culture filtrate, and the purified xylanases I and II favored the release of chromophores at 237 nm, and release of reducing sugars. Although, the enzymes present in the culture filtrate show better adequacy than the purified ones in order to release chromophores, they show absorption in different wave lengths. In other words, it was verified that the enzymes present in the culture filtrate have the best potential to favor the further bleaching of the banana tree pseudo-stem kraft pulp.

Key words: *Penicillium chrysogenum*; Xylanase; Enzyme purification; Enzymatic bleaching; Chromophores

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura hipotética da xilana em uma planta mostrando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanases microbianas.....	23
Figura 2 – Influência do meio e tempo de cultivo na atividade de xilanase das linhagens IFO-4626 e M-85 de <i>P. chrysogenum</i>	50
Figura 3 - Efeito do tempo de cultivo na atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de <i>P. chrysogenum</i> em MMF.....	52
Figura 4 - Efeito do tempo de cultivo na produção de massa seca e na atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de <i>P. chrysogenum</i> cultivada em diferentes meios.....	54
Figura 5 - Influência do meio (Palha de Cana; Fibra de Coco; Casca de Arroz) e tempo de cultivo na atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de <i>P. chrysogenum</i>	58
Figura 6 – Biomassa micelial da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) com diferentes carboidratos (glicose, xilose, galactose ou carboximetilcelulose nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%).....	62
Figura 7 – Atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou xilana <i>oat spelt</i> mais diferentes carboidratos (glicose, xilose, galactose ou carboximetilcelulose) nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%.....	66
Figura 8 – Atividade de xilanase no sobrenadante após precipitações subseqüentes com sulfato de amônio.....	67
Figura 9 – Recuperação da xilanase da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> após dessalinização através de diálise ou através de coluna Sephadex G-25.....	68
Figura 10 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> . A amostra foi eluída em um gradiente linear de 0 a 1000mM de NaCl.....	70
Figura 11 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> . Eluição do tipo <i>step-wise</i> (0, 200, 400, 600, 800, 1000mM de NaCl).....	71

Figura 12 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> . Eluição do tipo <i>step-wise</i> (250 e 1000mM de NaCl).....	72
Figura 13 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> . Eluição do tipo <i>step-wise</i> (100, 250 e 1000mM de NaCl).....	73
Figura 14 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> . Eluição do tipo <i>step-wise</i> (100 e 1000mM de NaCl).....	75
Figura 15 – Perfil SDS-PAGE em gel com 10% de acrilamida.	79
Figura 16 – Massa molecular das xilanases I e II em cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S200 (26/60)).....	80
Figura 17 – Perfil PAGE em gel com 10% de acrilamida.....	81
Figura 18 – Efeito do pH sobre a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura e nas xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	82
Figura 19 – Efeito da temperatura sobre a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura e nas xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	83
Figura 20 – Estabilidade em diferentes valores de pH das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	85
Figura 21 – Estabilidade térmica a 40°C das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	86
Figura 22 – Estabilidade térmica a 50°C das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	87
Figura 23 – Estabilidade térmica a 60°C das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	88

Figura 24 – Efeito de íons metálicos e outras substâncias na atividade das xilanases I, II e do complexo xilanolítico produzido pela linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	92
Figura 25 – Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos Km e $V_{máx}$ das xilanases presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	93
Figura 26 – Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos Km e $V_{máx}$ das xilanases I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	95
Figura 27 – Pré-hidrólise e polpação kraft do pseudocaulo da bananeira.	98
Figura 28 – Papel obtido após filtração da polpa em funil de Büchner.....	99
Figura 29 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático e das xilanases parcialmente purificadas I e II na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaulo de bananeira com espectro de absorção em 237nm	102
Figura 30 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático e das xilanases parcialmente purificadas I e II na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaulo de bananeira com espectro de absorção em 254nm	103
Figura 31 - Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático e das xilanases parcialmente purificadas I e II na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaulo de bananeira com espectro de absorção em 280nm	104
Figura 32 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático e das xilanases parcialmente purificadas I e II na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaulo de bananeira com espectro de absorção em 465nm	105
Figura 33 - Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático e das xilanases parcialmente purificadas I e II na liberação de açúcares redutores da polpa de pseudocaulo de bananeira.....	106
Figura 34 - Efeito de diferentes tempos de reação na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaulo de bananeira, usando enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de <i>P. chrysogenum</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de bananas e quantidade de resíduos gerados pela cultura da banana em todo o mundo, na América do Sul e no Brasil entre os anos de 2001 e 2003.....	21
Tabela 2 – Características bioquímicas de xilanases de alguns microrganismos.....	26
Tabela 3 – Atividade de xilanase (U/mL) para as linhagens IFO-4626 e M-85, meios e tempos de cultivo.....	49
Tabela 4 – Teste de Tukey para as médias de massa seca (g) e atividade de xilanase (U/mL) para diferentes meios e tempos de cultivo da linhagem IFO-4626.....	53
Tabela 5 - Atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono	55
Tabela 6 - Atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 em diferentes meios e tempos de cultivo.....	57
Tabela 7 – Biomassa micelial da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1% e não se adicionou xilana <i>oat spelt</i>	59
Tabela 8 – Biomassa micelial da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou 0,3% de xilana de <i>oat spelt</i> e diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%.....	61
Tabela 9 – Atividade de xilanase no filtrado de cultura após cultivo da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1% e não se adicionou xilana <i>oat spelt</i>	63
Tabela 10 – Atividade de xilanase no filtrado de cultura após cultivo da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou 0,3% de xilana de <i>oat spelt</i> mais diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%	65
Tabela 11 – Purificação das Xilanase I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> em DEAE-Sephacel (Eluição com 0, 100, 250 e 1000mM de NaCl)....	74
Tabela 12 – Purificação das Xilanase I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i> em DEAE-Sephacel (Eluição com 0, 100 e 1000mM de NaCl).....	76

Tabela 13 – Efeito de íons metálicos e outras substâncias na atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases I e II da linhagem IFO-4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	90
Tabela 14 – Característica da fração fibrosa, polpa e licores residuais obtidos da pré-hidrólise e polpação kraft do pseudocaule de bananeira.....	97
Tabela 15 – Rendimento bruto, depurado e número Kappa da polpa obtida pelo processo kraft com carga de álcali ativo de 16% e pseudocaules colhidos em julho de 2007	100

1 Introdução

O presente trabalho insere-se em um contexto interdisciplinar de pesquisa que busca o aproveitamento adequado, técnica e economicamente viável, dos resíduos da agroindústria da banana do Vale do Ribeira, SP, com o objetivo final de contornar problemas ambientais associados àquela agroindústria e, de modo socialmente justo, viabilizar a geração de empregos sustentáveis naquela região, cuja legislação não permite métodos químicos convencionais para o tratamento de fibras para uso têxtil ou na indústria papeleira.

A otimização do processo de branqueamento de polpa celulósica de musáceas através do emprego de enzimas xilanolíticas permitirá o desenvolvimento de um processo de branqueamento com maior eficiência e menor impacto ao ambiente, com possibilidade de aplicação no Vale do Ribeira, SP e outras regiões sob legislação de proteção ambiental. Apesar do seu possível uso em diversos processos industriais, as xilanases ganharam importância devido à sua aplicação no pré-branqueamento de polpa kraft, substituindo compostos químicos contendo cloro. Esses químicos contendo cloro, após o branqueamento da polpa, formam substâncias conhecidas como organoclorados, que são tóxicas, mutagênicas, persistentes e se bioacumulam, causando numerosos distúrbios prejudiciais aos ecossistemas. Como a indústria papeleira precisa se adequar à legislação ambiental em relação à liberação dos efluentes e está sofrendo cada vez mais a pressão de grupos ligados à proteção ambiental, as xilanases se tornaram a opção mais viável para a diminuição dos compostos clorados usados no branqueamento da polpa celulósica. Muitas tecnologias para o branqueamento da polpa celulósica sem o uso de cloro já são conhecidas, porém o uso de enzimas, além de ser um método efetivo, possui um baixo custo quando comparada às outras tecnologias.

O emprego de enzimas purificadas e adequadamente caracterizadas é uma medida relevante para a elevação da eficiência do processo de branqueamento enzimático, redução do volume dos efluentes e redução da demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) dos mesmos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar bioquimicamente xilanases produzidas pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e aplicá-las no processo de branqueamento da polpa celulósica de pseudocaule de bananeiras frutíferas.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar o meio e tempo de cultivo para a produção de xilanase pelas linhagens IFO-4626 e M-85 de *Penicillium chrysogenum*;
- Ajustar o protocolo de purificação para xilanases de *P. chrysogenum*, desenvolvido por Haas et al. (1992), a fim de se obter um processo aplicável em escala industrial ou semi-industrial;
- Determinar a eficiência do concentrado enzimático no branqueamento da polpa celulósica de pseudocaule de musáceas em diferentes etapas do processo de purificação das xilanases;
- Determinar a quantidade de enzima adequada para o branqueamento nas diferentes etapas a serem estudadas;

3 Revisão de Literatura

3.1 Cultura da Bananeira

A bananeira pertence à divisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae, ordem Scitaminae e família Musaceae (CRONQUIST, 1981). A família Musaceae é constituída por dois gêneros: *Musa* (bananas comestíveis) e *Ensete* (bananas silvestres). O primeiro apresenta 35 espécies e o segundo um total de 7 espécies (ROCHELLE et al., 1991).

A bananeira é um vegetal herbáceo completo. Possui um pseudocaule aéreo, também chamado de estirpe ou “tronco”, com formato de um cilindro irregular e bainhas foliares sobrepostas, tendo em seu interior o “palmito” ou coração central. No prolongamento das bainhas foliares encontram-se as folhas. O cacho é composto pelas partes: engaço, ráquis, pencas de bananas e botão floral ou “coração” (MEDINA, 1961). A emissão de novos indivíduos ocorre através do rizoma.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de banana, tendo alcançado em 2005 uma produção de 6,7 milhões de toneladas, ficando dessa forma atrás somente da Índia, que produziu nesse mesmo ano 16,8 milhões de toneladas dessa fruta (FAOSTAT data 2006a).

As regiões de destaque no Brasil para a produção de banana são: o estado de São Paulo – com os municípios de Registro, Itariri, Eldorado, Miracatu, Sete Barras, Cajati, Pedro de Toledo e Jacupiranga; o norte de Minas Gerais – Janaúba, Jaíba, Pirapora, Montes Claros e Itacarambi; o Norte de Santa Catarina – Corupá, Massaranduba, Jaraguá do Sul, Guaramirim, Praia Grande, Luis Alves e Schröder; e o nordeste – Petrolina e Juazeiro (MATTHIENSE; BOTEON, 2006).

No Vale do Ribeira, a bananicultura se destaca na economia agrícola regional, vindo, a seguir, a produção de feijão, arroz e milho e a criação de gado (Instituto de Terras do Estado de São Paulo (ITESP), 2000). A bananicultura apresenta elevada importância social e econômica em algumas regiões, possuindo papel importante como fonte de alimentação, fixação de mão-de-obra no campo e geração de divisas para o país (SOFFNER, 2001).

3.1.1 Resíduos da bananeira

A idéia usual de resíduo ou “o que sobra”, decorre da agregação aleatória de elementos bem definidos que, quando agrupados, transformam-se em uma massa sem valor comercial e com potencial de agressão ambiental variável segundo a sua composição (FIGUEIREDO, 1995).

A norma brasileira NBR – 10.004 define resíduos sólidos como: resíduos nos estados sólidos e semi-sólidos que resultam de atividades da comunidade, de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos d’água, ou exijam para isto soluções técnica e economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (ABNT, 1987a:1).

Na atividade bananicultura, após a colheita da fruta, o cacho é conduzido para outros locais e as outras partes da planta permanecem no bananal. A planta entra em senescência e morre, encerrando o ciclo vegetativo, tornando-se resto de cultura ou resíduo agrícola (EMBRAPA, 1994). Na Tabela 1 pode-se observar a quantidade de bananas produzidas e a quantidade de resíduos gerados pela cultura da banana no mundo, na América do Sul e no Brasil entre os anos de 2001 e 2003.

Tabela 1 – Produção de bananas e quantidade de resíduos gerados pela cultura da banana em todo o mundo, na América do Sul e no Brasil, em toneladas, entre os anos de 2001 e 2003

Local	2001		2002		2003	
	Produção	Resíduos	Produção	Resíduos	Produção	Resíduos
Mundo	65.210.563	8.384.383	68.318.327	8.544.595	69.816.278	8.718.075
América do Sul	15.351.757	1.832.965	14.856.832	1.207.580	15.615.631	1.290.550
Brasil	6.176.960	926.546	6.422.860	963.429	6.774.980	1.016.249

Fonte: FAOSTAT data (2006b)

Muitas espécies de bananeiras, do gênero *Musa*, têm sido exploradas para comercialização em pequena escala das fibras “técnicas” ou “comerciais” do pseudocaule, que se constituem em

feixes fibrosos com comprimentos relacionados ao comprimento do pseudocaule. Há muitos anos vem sendo averiguada a viabilidade técnica para produzir polpa celulósica a partir dos resíduos da bananeira, principalmente do pseudocaule e do engaço (SOFFNER, 2001).

O interesse brasileiro em utilizar o pseudocaule de bananeira para a produção de celulose para a manufatura de papéis não é recente. No início do século XVIII, já havia interesse da Coroa Portuguesa na exploração dessa matéria-prima (BARDI, 1982).

De acordo com Jarman et al. (1977) o pseudocaule da bananeira contém de 1,0 a 1,5% de fibras. Os outros constituintes são substâncias mucilaginosas (4 a 8%) e água (90 a 96%). Silva (1998) obteve sucesso na produção de celulose kraft branqueável de pseudocaule de bananeira e sugere que essa polpa é adequada para confecção de um papel especial, utilizado na restauração de documentos. Cordeiro et al. (2004) também obteve sucesso na polpação de pseudocaule de bananeira (*Musa acuminata*).

3.2 A xilana e sua hidrólise

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são celulose, hemicelulose e lignina em proporções que variam de 40 a 50%, 15 a 30% e 10 a 30%, respectivamente (DEKKER, 1985). Estas variações, segundo Tsao (1986), ocorrem em função da espécie vegetal, do tipo de colheita e das condições de armazenamento do material.

A maior parte da hemicelulose é constituída por moléculas relativamente pequenas, contendo entre 70 e 200 unidades de monossacarídeos (COUGHLAN, 1992). Polímeros de hemicelulose podem conter os mais variados resíduos de açúcar na sua composição, como: D-xilose, D-glicose, D-galactose, D-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, grupos O-acetil e ésteres ferulotato ou coumarato, ligados via resíduos de L-arabinose à cadeia principal (PULS; POUTANEN, 1989).

Dentre as hemiceluloses, a maior classe é a da xilana, que depois da celulose é o polissacarídeo mais abundante na madeira e nos resíduos agrícolas. Na célula vegetal, a xilana está localizada na matriz da parede celular, formando uma interface entre a lignina e outros polissacarídeos, sendo facilmente encontrada na parede celular secundária. Desse modo, a xilana tem uma função adesiva mediada por interações covalentes e não-covalentes com a lignina,

celulose e outros polímeros que são essenciais para a manutenção da integridade da parede celular (PRADE, 1995).

Na natureza, a xilana é completamente hidrolizada a monossacarídeos por uma ação sinérgica de diferentes enzimas (Figura 1). A heterogeneidade na estrutura da xilana é responsável pela diversidade dessas enzimas. O sistema de degradação da xilana inclui, principalmente, β -1,4-D-xilanases e β -D-xilosidase e outras enzimas como α -arabinofuranosidase, acetilxilano esterase, α -D-glucuronidase, ácido ferrúlico esterase e ácido p -coumárico esterase (BEG et al., 2001; DEKKER, 1983; FERREIRA FILHO, 1994; PRADE, 1995).

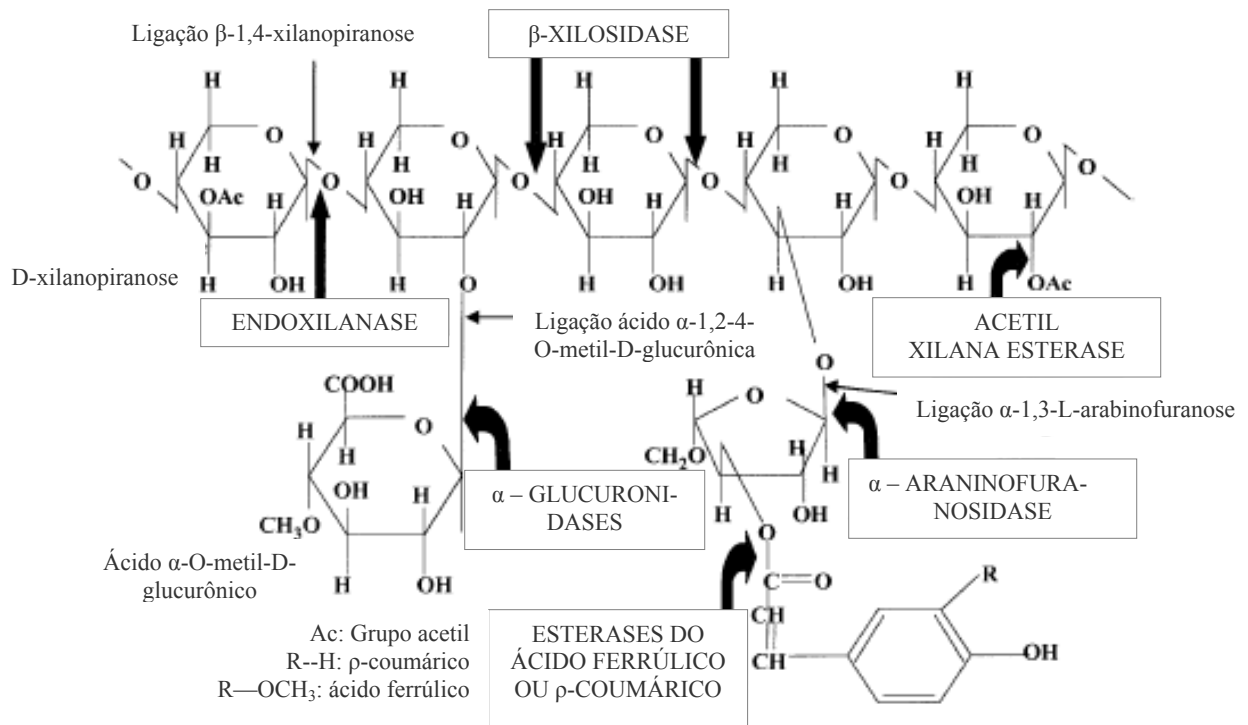


Figura 1 – Estrutura hipotética da xilana em uma planta mostrando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanases microbianas.

Fonte: Beg et al.(2001), traduzida

Segundo Wong, Tan e Saddler (1988), as ligações xilosídicas em lignocelulose não são todas equivalentes e igualmente disponíveis para enzimas xilanolíticas. A acessibilidade de algumas ligações muda durante o curso da hidrólise. Na composição do sistema enzimático, cada

enzima possui uma função especializada, sendo esta diversidade uma estratégia que o microrganismo pode usar para conseguir hidrólise total da xilana.

A xilana geralmente é acetilada e facilmente extraída da biomassa por hidrólise ácida ou enzimática (BIELY et al., 1986). A xilose, o principal monômero formador da xilana, é precursora de vários processos fermentativos, assim como a xilana é usada como indutora nos estudos de síntese de xilanase obtida biologicamente (BIELY, 1985).

Os resíduos lignocelulósicos podem ser convertidos por microrganismos a produtos de elevada importância econômica e social. A natureza polissacarídica destes resíduos não permite, entretanto, seu uso direto, sendo necessária uma etapa de hidrólise para que o aproveitamento seja eficiente e seletivo (DEKKER, 1985). Tal hidrólise pode ser conduzida por meios químicos, físicos ou biológicos.

Buchholz et al. (1981) estudaram a hidrólise de materiais lignocelulósicos empregando ácidos ou bases e alcançaram ótimos resultados. No entanto, além destes autores, Ladisch (1979), constatou a formação de subprodutos indesejáveis, tais como furfural, hidroximetilfurfural, subprodutos da lignina e outros inibidores da fermentação durante a hidrólise ácida, além de corrosão e problemas ambientais e econômicos. A hidrólise ácida exige, ainda, altos investimentos operacionais (LADISH, 1979; TSAO, 1986).

A hidrólise biológica, por sua vez, encontra barreiras pela falta do completo conhecimento das etapas do processo e da adaptação do microrganismo à degradação enzimática (BISARIA; GHOSE, 1981). O pré-tratamento fúngico de cavacos de Aspen (*Populus tremula* L.) teve um efeito ligeiramente negativo na remoção de lignina em comparação a cavacos não tratados. Porém, o pré-tratamento da polpa com xilanase aumentou a deslignificação (ATIK; IMAMOGLU; BERMEK, 2006). De acordo com Zhao, Li e Qu (2006), o pré-tratamento fúngico pode reduzir os custos do processo de polpação (energia e químicos usados no cozimento), melhorar as propriedades da polpa e reduzir o impacto ambiental da polpação. Entretanto, as desvantagens do pré-tratamento fúngico são o tempo prolongado do pré-tratamento (2 a 4 semanas) e a perda de produtividade devido ao simultâneo ataque do fungo aos polissacarídeos e lignina. Segundo esses pesquisadores, o uso isolado de enzimas pode evitar esses problemas.

A hidrólise enzimática apresenta baixos rendimentos (DAVID; FORNASIER, 1984), mas segundo Horton, Rivers e Emert (1980), não há corrosão nem formação de subprodutos, além dos açúcares permanecerem estáveis durante as diferentes condições do processo. Resultados

preliminares de Zhao, Li e Qu (2006) indicam que as propriedades físicas e a drenagem da polpa podem ser modificadas por tratamento enzimático usando enzimas purificadas. De acordo com eles, um tratamento envolvendo uma mistura com uma proporção adequada de celulase/xilanase tem efeitos benéficos nas propriedades da polpa de palha de trigo.

3.3 Sistema xilanolítico

As xilanases têm sido encontradas freqüentemente em fungos e bactérias e suas características físico-químicas variam amplamente. Entre aquelas de origem fúngica, os pesos moleculares situam-se entre 10.000 e 83.000 Daltons e seus pontos isoelétricos (pI) entre 3,4 e 9,6 (CARMONA, 1995; ZANOELO, 2001). Outras características bioquímicas de xilanases microbianas estão descritas na Tabela 2.

Os fungos constituem a fonte mais comum de xilanases (DEKKER; RICHARDS, 1976) e seus sistemas enzimáticos têm sido os mais extensivamente estudados (BASTAWDE, 1992). Entre as endoxilanases produzidas por fungos, dois tipos são reconhecidos: as que liberam L-arabinose e arabinoglucuronoxilanas e aquelas que não liberam (DEKKER, 1979). Entretanto, ambas são capazes de hidrolisar glucuronoxilanas e β -1,4-D-xilanas (BISARIA; GHOSE, 1981).

A distinção entre xilanases e β -xilosidases no sistema xilanolítico tem sido reconhecida (REILLY, 1981).

Segundo Reilly (1981), três β -xilosidases foram classificadas como exoxilanases, após a detecção de atividade em xilana. Exoxilanases podem aumentar a taxa de hidrólise da xilana, por atacar xilo-oligossacarídeos, os quais são liberados por endoxilanases e hidrolisados por β -xilosidases. Essa forma de cooperação pode não ser adequada e suficiente para aumentar a extensão da hidrólise, a menos que outros fatores estejam envolvidos (por exemplo, acessibilidade de ligações glicosídicas em xilo-oligossacarídeos curtos e(ou) ramificados, redução dos produtos de inibição, ou quantidades de β -xilosidade extracelular) (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

Reese, Maguire e Parrish (1973) relataram que, em culturas fúngicas, a xilosidase permanece com o micélio durante os primeiros estágios de crescimento, sendo em seguida liberada no meio, por secreção ou como resultado da lise da célula. Por isso, xilosidases fúngicas têm sido encontradas na fração de proteína extracelular (DELEYN et al., 1978).

Tabela 2 – Características bioquímicas de xilanases de alguns microrganismos

(continua)

Microrganismo	Massa molecular em SDS-PAGE	Temperatura ótima	pH ótimo	Km	V _{máx}	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	...	60-65°C	5,5-6,5	SZENDEFY; SZAKACS; CHRISTOPHER (2006)
<i>Aspergillus niger</i>	...	50°C	5,0-6,0	(2) 8,4 ± 0,1 mg/ mL	(2) 9490 ± 75 µmol/ min.mg proteína	SRIPRANG et al. (2006)
<i>Aspergillus versicolor</i>	32 kDa	55°C	6,0-7,0	(1) 2,3 mg/ mL	(1) 5,6 µmol/ mL.min	CARMONA et al. (2005)
<i>Aspergillus versicolor</i>	19 kDa	55°C	6,0	(1) 6,5 mg/ mL	(1) 1440 µmol/ min.mg proteína	CARMONA et al. (1998)
<i>Aspergillus</i> sp. (Linhagem 5)				(1)	(1)	GAWANDE;
Xilanase livre	55, 32, 15 kDa	50°C	5,5	5,65 mg/mL	0,5 µmol/ min	KAMAT (1998,
Xilanase imobilizada	55, 32, 15 kDa	50°C	5,5-6,5	8,3 mg/ mL	0,5 µmol/ min	1999)
<i>Aspergillus</i> sp. (Linhagem 44)				(1)	(1)	GAWANDE;
Xilanase livre	53, 28 kDa	50°C	5,5	7,0 mg/ mL	0,5 µmol/ min	KAMAT (1998,
Xilanase imobilizada	53, 28 kDa	50°C	5,5-6,0	9,0 mg/ mL	0,3 µmol/ min	1999)

Tabela 2 – Características bioquímicas de xilanases de alguns microrganismos

(continuação)						
Microrganismo	Massa molecular em SDS-PAGE	Temperatura ótima	pH ótimo	Km	V _{máx}	Referência
<i>Penicillium expansum</i>	...	40°C	5,5	3,03 mM	(1) 0,027 μmol/ min/ μg de proteína	QUERIDO et al. (2006)
<i>Penicillium canescens</i>	31 kDa	55-61°C	5,9	SINITSYNA et al. (2003)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	35 kDa	40°C	6,0	(1) 4,1 mg/mL (2) 4,2 mg/mL	...	HAAS et al. (1992)
<i>Fusarium proliferatum</i>	22,4 kDa	55°C	5,0-5,5	(1) 8,4 mg/mL (3) 9,6 mg/mL	(1) 856 μmol/ min.mg de proteína (3) 778 μmol/ min.mg de proteína	SAHA (2002)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	25, 47 e 57 kDa	...	6,0-7,0	BARAZNENOK et al. (1999)

Tabela 2 – Características bioquímicas de xilanases de alguns microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Massa molecular em SDS-PAGE	Temperatura ótima	pH ótimo	Km	V _{máx}	Referência
<i>Streptomyces galbus</i>	...	50°C	6,5	KANSOH; NAGIEB (2004)
<i>Trichoderma inhamatum</i>						SILVA (2006)
Xilanase I	19 kDa	50°C	5,0-5,5	(1) 14,46 mg/mL (2) 1,59 mg/mL	(1) 2680,24 µmol/ min.mg proteína (2) 462,20 µmol/ min.mg proteína	
Xilanase II	21 kDa	45-55°C	5,5	(1)10,65 mg/mL (2) 4,04 mg/mL	(1) 4553,72 µmol/ min.mg proteína (2) 1972,74 µmol/ min.mg proteína	
<i>Trichoderma harzianum</i>	18 kDa	45°C	...	(1) 13,66 mg/mL (2)16,85 mg/mL	...	SILVEIRA et al. (1999)

Tabela 2 – Características bioquímicas de xilanases de alguns microrganismos

Microrganismo	Massa molecular em SDS-PAGE	Temperatura ótima	pH ótimo	Km	V _{máx}	(conclusão)
						Referência
<i>Acrophialophora nainiana</i>	17 kDa	50°C	6,0	(1) 0,731 mg/mL (2) 0,343 mg/mL	...	XIMENES et al. (1999)
<i>Scytalidium thermophilum</i>	16 kDa	60°C	5,0	(1) 4,5 mg/mL	(1) 128 µmol/ min.mg de proteína	ZANOELO (2001)
<i>Bacillus</i> sp. Sam-3	...	60°C	8,0	SHAH et al. (1999)
<i>Clostridium absonum</i>					µmol/ min.mg de proteína	RANI; NAND (2001)
Xilanase I	150 kDa	75°C	6,5-7,5	(2) 1,1% (3) 2,9% (1) 3,8%	(2) 354,54 (3) 280,00 (1) 220,00	
Xilanase II	95 kDa	80°C	6,5-7,5	(2) 1,4% (3) 3,2% (1) 4,2%	(2) 363.63 (3) 222,10 (1) 300,11	

Nota: ... Dado numérico não disponível.

(1) xilana de *oat spelt*

(2) xilana de *birchwood*

(3) xilana de *larchwood*

Há poucos microrganismos que produzem um único tipo de xilanase, como verificado por Haas et al. (1992) em *Penicillium chrysogenum* e Saha (2002) para *Fusarium proliferatum*. Múltiplas xilanases têm sido descritas em muitos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, tanto através de separações parciais quanto a partir de purificações convencionais (BASTAWDE, 1992; RANI; NANDI, 2001; SILVEIRA et al., 1999; WONG; TAN; SADDLER, 1988).

A presença de múltiplas xilanases pode estar relacionada com a hidrólise de outros polissacarídeos, contendo xilose, ou de substratos secundários. Além disso, desde que a xilana é um fator importante na coesão da fibra, a função primária de múltiplas xilanases pode estar relacionada à destruição da integridade da fibra, expondo outros componentes lignocelulósicos a outras hidrolases. A quebra da ramificação e(ou) a atividade transferase de algumas xilanases, ao invés da hidrólise de ligações xilosídicas, são relatadas na literatura (PINHEIRO, 1999). É possível também que o significado da existência de múltiplas xilanases provenha da necessidade de funcionar sob diferentes condições físico-químicas, já que suas propriedades podem diferir substancialmente (WONG; TAN; SADDLER, 1988). A maior parte dos casos de xilanases múltiplas, no entanto, parece estar relacionada à multiplicidade genética (PRADE, 1995). As três xilanases purificadas a partir do filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* tiveram suas composições em aminoácidos determinadas, sendo sugerido que elas devem ser produtos de genes distintos (WONG; TAN; SADDLER, 1986).

3.4 Aplicações das Xilanases

As enzimas xilanolíticas têm sido amplamente estudadas principalmente devido a seu potencial biotecnológico em vários processos industriais. Alguns possíveis usos das xilanases são citados na revisão de Beg et al. (2001) e estão listados a seguir: a) Pré-branqueamento de polpa kraft, substituindo processos poluentes à base de cloro e melhorando a qualidade da polpa; b) Melhora na eficiência de conversão alimentar e ganho de peso em frangos, devido à redução da viscosidade intestinal causada pela incorporação de xilanases na dieta desses animais; c) Melhora na qualidade do pão, devido a um aumento no seu volume específico ocasionado pelo uso de xilanases; d) Tratamentos de resíduos hemicelulósicos, pela conversão de xilana em xilose; e) Tratamento de células de plantas com xilanase pode induzir uma glicosilação e uma acetilação

graxa de fitoesteróis; f) Xilanases são usadas em associação com celulases e pectinases para clarificar mosto (vinho) e sucos, para liquefazer frutas e vegetais e para tratar forragens, melhorando sua digestibilidade para ruminantes e facilitando a compostagem; g) Transglicosilação direta da xilana para produção de alquil glicosídeo, um dos mais promissores candidatos a surfactante; h) Aromatização de mostos, vinhos e sucos de fruta; i) Melhoria na maceração da parede celular para produção de protoplastos de plantas; j) Em sinergismo com outras enzimas, como manase, ligninase, xilosidase, glucanase, glicosidase etc., a xilanase pode ser usada para a geração de combustíveis, como etanol e xilitol, a partir de biomassa lignocelulósica; l) Enzimas xilanolíticas em conjunto com enzimas pectinolíticas possuem potencial de aplicação na degomagem de fibras como linho, sisal, juta e rami.

Segundo Biely (1985), a aplicação do sistema xilanolítico se divide em duas categorias: uma, livre de celulases, e a outra com uso associado de polissacaridases. Como exemplo da primeira categoria, tem-se o uso de β -xilanase no processo de biopolpação nas indústrias de papel e celulose e no processamento de fibras vegetais como linho, juta e rami. Neste caso, um sistema xilanolítico puro, ou seja, sem a presença de celulases, torna tais processos mais eficientes, uma vez que a celulose é preservada. A ação de xilanase no tratamento das polpas celulósicas auxilia a remoção da lignina que resta após cozimento e que confere a cor amarelada às polpas. Com este tratamento adicional, a quantidade de produtos químicos alvejantes usados pode ser diminuída, principalmente o cloro. Como consequência, tem-se, além da melhor qualidade do papel, a redução de problemas ambientais (WONG; TAN; SADDLER, 1988). A xilanase produzida por *Aureobasidium pullulans* CBS 58475 foi encontrada livre de celulases, sendo assim indicada para indústria de papel, bem como para o processamento de fibras vegetais para uso têxtil (DOBBERSTEIN; EMEIS, 1989). Em nosso laboratório, Leites, Pelissari e Molina (2000) e Pallu, Erlo e Molina (2001, 2002), conseguiram bons resultados respectivamente na degomagem e branqueamento de fibras celulósicas de bananeiras frutíferas utilizando pectinases (LEITES; PELISSARI; MOLINA, 2000) e xilanases (PALLU; ERLO; MOLINA, 2001 e 2002) produzidas pelo fungo *Penicillium chrysogenum* linhagens IFO-4626, M-85 e outras obtidas ao longo de nossas pesquisas.

Dentro da segunda categoria acima citada, o uso associado de xilanases, celulases e pectinases se aplica à remoção de sólidos em suspensão no processamento de sucos de frutas e

liquefação de vegetais, apresentando características favoráveis também para outras aplicações na indústria de alimentos (BIELY, 1985).

3.4.1 Branqueamento enzimático

Durante a última década, o potencial de aplicação biotecnológico da xilana e enzimas xilanolíticas tem sido de interesse particular para muitos pesquisadores. As xilanases ganharam importância devido à sua aplicação no pré-branqueamento de polpa kraft, substituindo compostos químicos contendo cloro. Tais enzimas têm um papel importante na reciclagem de fibras e na purificação da celulose para a preparação da polpa dissolvida.

Segundo Bajpai (2004), o processo kraft possui o melhor custo benefício para o processo de polpação. Porém, uma desvantagem é a cor da polpa, que se torna marrom escura durante o processo de cozimento devido às modificações que ocorrem na lignina residual das fibras. O branqueamento da polpa kraft é feito em uma seqüência com várias etapas. A deslignificação, normalmente, é feita com água clorada seguida por extração alcalina; o incremento na alvura é feito com o uso de dióxido de cloro (BAJPAI, 2004). O efluente originado dessas operações, além do problema da coloração, contém compostos orgânicos clorados, dos quais 75% são encontrados na forma de clorolignina polimérica, sendo o restante compostos de baixa massa molecular, incluindo clorofenóis (BAJPAI, 2004).

O pré-tratamento de polpa kraft com xilanase tem sido relatado com baixo consumo de produtos químicos, principalmente cloro e dióxido de cloro. O branqueamento enzimático resulta da clivagem das ligações entre lignina e carboidratos, o qual leva à abertura da estrutura da polpa (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). VIIKARI et al. (1986) foram os primeiros a demonstrar que o tratamento de polpa com hemicelulases pode substituir subsequente a necessidade de cloro para o branqueamento da polpa; outros pesquisadores também confirmaram esses estudos. Segundo Sunna e Antranikian (1997), estes processos de pré-branqueamento reduziram o uso de compostos clorídricos em até 30%. Como resultado, houve a diminuição de 15 a 20% na liberação de organoclorados altamente tóxicos para o meio ambiente nos efluentes das indústrias de papel.

Os mecanismos pelos quais as xilanases facilitam o branqueamento ainda não foram completamente elucidados. Uma hipótese é despolimerização pela xilanase da hemicelulose

precipitada na superfície da fibra, abrindo a estrutura da polpa para o acesso dos reagentes químicos usados no branqueamento (PAICE et al., 1992). Patel, Grabski e Jeffries (1993) sugerem que as xilanases liberam compostos cromóforos associados a carboidratos. Convencionalmente, a remoção da lignina pela seqüência de branqueamento é determinada pelo número Kappa. Entretanto, os compostos cromóforos não são necessariamente derivados de ou associados à lignina residual (ELEGIR; SYKES; JEFFRIES, 1995). Em sua revisão, Kenealy e Jeffries (2003) esclarecem que ácidos hexenurônicos são formados durante a polpação kraft a partir de resíduos de ácido 4-metil-glucurônico presentes na xilana. A clivagem da xilana permite a remoção desses grupos, permitindo a redução de químicos que seriam necessários para o branqueamento desses resíduos. Além disso, a remoção do ácido hexenurônico por xilanases ajuda a prevenir a reversão de alvura de polpas kraft tratadas.

Muitos trabalhos demonstram a eficácia do pré-tratamento com xilanases para o incremento da branqueabilidade de polpas kraft com diminuição do uso de agentes químicos. Roncero et al. (2000) observaram um aumento da branqueabilidade de polpas kraft de *Eucalyptus* e redução da quantidade de agentes usados no branqueamento após o pré-tratamento da polpa com xilanases. A redução de químicos para o branqueamento também foi observada por Shatalov e Pereira (2007), que também relatam um acréscimo na alvura e no grau de deslignificação de polpas de *Arundo donax* L. após pré-tratamento enzimático. Zhao, Li e Qu (2006), usando xilanase de *Aspergillus niger* An76 no pré-tratamento de polpa de palha de trigo, observaram um aumento de 5,5% ISO na alvura da polpa quando comparadas com polpas não tratadas com enzimas e sugerem que o pré-tratamento enzimático facilita a remoção de fragmentos cromóforos da polpa. Segundo Elegir, Sykes e Jeffries (1995), as xilanases exibem diferentes habilidades para facilitar o branqueamento, mas o aumento do branqueamento geralmente está correlacionado à liberação de cromóforos da polpa.

Baraznenok et al. (1999) purificaram três xilanases de *Chaetomium cellulolyticum* com pesos moleculares de 25, 47 e 57 kDa, sendo uma importante característica da xilanase de 25kDa sua alta estabilidade a pH 9. Baseado na absorção de compostos cromóforos a 237nm, todas as três xilanases apresentaram efeito significativo no branqueamento de polpa de eucalipto, sendo que a pH 9, a xilanase com peso de 25kDa, apresentou um maior efeito no branqueamento da polpa em relação às outras xilanases isoladas e à enzima comercial Ecopulp TX 200.

Elegir, Sykes e Jeffries (1995), utilizando endoxilanases purificadas de *Streptomyces*, verificaram, através da liberação de cromóforos, um efeito significativo dessas no branqueamento e aumento do brilho de polpa kraft. Garg, Roberts e McCarthy (1998) também encontraram, analisando a redução do número kappa e absorção de cromóforos a 280nm, um efeito significativo no branqueamento de polpa kraft utilizando xilanase de *Streptomyces thermoviolaceus*, apesar dessa xilanase ter sido menos efetiva no branqueamento e redução do uso de cloro quando comparada com produtos comerciais.

Apesar das várias pesquisas que sugerem que xilanases melhoram as características da polpa, facilitando o branqueamento da polpa celulósica, a aplicabilidade dessas enzimas ainda é limitada em escala comercial. Os trabalhos iniciais com xilanases sendo usadas como agentes de pré-branqueamento foram baseadas em xilanases fúngicas, mas devido à presença de celulasas, baixa estabilidade e pH ótimo das enzimas, seu uso em maior escala não foi possível (Beg et al., 2001). De acordo com Beg et al. (2001), Kenealy e Jeffries (2003), para o desenvolvimento apropriado das xilanases como agentes de pré-branqueamento, essas enzimas precisam ser estáveis a alto pH e temperatura.

Dessa forma, ressalta-se a importância dos objetivos do presente trabalho, que visa, através do uso de enzimas purificadas e caracterizadas bioquimicamente, contribuir para a otimização do uso de xilanases no pré-branqueamento de polpa kraft de pseudocaules de bananeiras frutíferas. Cabe ressaltar que a maior parte das pesquisas de branqueamento enzimático foram realizados nos últimos anos com polpa kraft de materiais *hardwood* e *softwood* (ATIK; IMAMOGLU; BERMEK, 2006; BARAZNENOK et al., 1999; ELEGIR; SYKES; JEFFRIES, 1995; KANSOH; NAGIEB, 2004; MEDEIROS et al., 2007; RONCERO et al., 2000; SALLES et al., 2005; SANDRIM et al., 2005). Trabalhos com matérias-primas não-madeira, como o pseudocaulo de bananeira, também foram realizados, mas em menor escala (CHAUHAN et al., 2006; JIANG et al., 2006; KULKARNI; RAO, 1996; NINAWA; KUHAD, 2006; SHAH et al., 1999; SHATALOV; PEREIRA, 2007; ZHAO; LI; QU, 2006). Assim, além dos benefícios ambientais diretos do processo enzimático em si, cabe salientar a importância do presente estudo por estar associado a uma fonte não madeira para a indústria de papel. Existindo, ainda, a possibilidade no incremento da renda de populações como a do Vale do Ribeira, SP, por meio do fornecimento dessa matéria-prima para a indústria ou mesmo através do pré-processamento das

fibras do pseudocaule de bananeira, uma vez que essas enzimas podem ser usadas em regiões sob proteção ambiental.

4 Material e Métodos

4.1 Meios de Cultura e Soluções

4.1.1 Meio Completo – MC (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Dextrose.....	10,0g
Peptona.....	2,0g
Caseína Hidrolizada.....	1,5g
Extrato de Levedura.....	2,0g
Extrato de Malte.....	2,0g
Solução de Vitaminas (item 4.1.6).....	1,0mL
Ágar comum.....	15g

A dissolução dos sais foi feita em água destilada (volume final 1000 mL), o pH foi ajustado para 6,8 com NaOH e/ou KCl. O meio foi autoclavado a 0,5 atm por 30 minutos.

4.1.2 Meio Mínimo Ferreira – MMF (FERREIRA, 1999)

K ₂ HPO ₄	6,8g
KH ₂ PO ₄	3,4g
(NH ₄) ₂ .SO ₄	1,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,1g
Extrato de levedura.....	0,6g
pH 7,0	

Como fonte de carbono foi utilizada 0,3% (p/v) de xilana de *oat spelt* ou 2% (p/v) dos diferentes resíduos agrícolas estudados. A dissolução dos sais foi feita em água destilada (volume final 1000 mL). O meio foi autoclavado a 0,5 atm por 30 minutos.

4.1.3 Meio Mínimo Haas – MMH (HAAS et al., 1992)

NaNO ₃	3,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
Fe ₂ .SO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g
Xilana de <i>oat spelt</i>	10,0g

A dissolução dos sais e da xilana foi feita em solução tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,0 (volume final 1000 mL). O meio foi autoclavado a 0,5 atm por 30 minutos.

4.1.4 Solução salina

NaCl 0,85% (p/v) dissolvido em água destilada. Foram distribuídos 9,5 mL da solução por tubo, seguindo-se autoclavagem dos mesmos a 1,0 atm por 20 minutos.

4.1.5 Solução de Tween-80

Tween-80 0,1% (v/v) em água destilada. Foram distribuídos 3,5 mL por tubo de ensaio, seguindo-se autoclavagem dos mesmos a 1,0 atm por 20 minutos.

4.1.6 Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico.....	100mg
Ácido ρ -aminobenzóico.....	10mg
Biotina.....	0,2mg
Piridoxina.....	50mg
Riboflavina.....	100mg
Tiamina.....	50mg

As vitaminas foram solubilizadas em água destilada esterilizada (volume final 100 mL). A solução foi colocada em frasco escuro previamente esterilizado e colocada em banho-maria a 100°C por 15 minutos, após esfriar foi estocada sob refrigeração.

4.1.7 Solução de DNS

Ácido 3,5, dinitrossalicílico.....	10,0g
NaOH (2N).....	300mL
KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4 H ₂ O.....	300g

O preparo foi realizado sob agitação na seguinte ordem:

- 1º) DNS em um pouco de água destilada
- 2º) NaOH (2 N)
- 3º) KNaC₄H₄O₆.4 H₂O
- 4º) O volume foi ajustado para 1000 mL com água destilada

4.2 Microrganismos

Linhagem IFO-4626 (Q 176) do fungo *Penicillium chrysogenum* e o seu mutante M-85 (selecionado em trabalhos anteriores por sua alta capacidade de produção de pectinases), crescidos em meio completo sólido (PONTECORVO et al., 1953 modificado por AZEVEDO; COSTA, 1973) a 28°C por 7 dias.

4.3 Resíduos Agroindustriais

As palhas de cana-de-açúcar e as cascas de arroz foram secas a temperatura ambiente, moídas e peneiradas a 1 mm. As fibras de coco, após secarem à temperatura ambiente, foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura. Antes do uso, os diferentes resíduos foram secos em estufa a 60°C até peso constante.

4.4 Condições de cultivo para produção enzimática

Das linhagens de *P. chrysogenum* cultivadas em meio completo foi realizada uma raspagem dos esporos que foram colocados em solução salina. A concentração de esporos foi ajustada para 10^7 esporos/mL. O inóculo foi feito colocando-se 1mL da solução de esporos em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL dos diferentes meios minerais analisados. Os frascos de Erlenmeyers foram mantidos em agitação de 150 rpm, a 25°C por diferentes períodos de tempo. Decorrido o tempo a ser estudado, as amostras foram filtradas sob vácuo e os filtrados obtidos tiveram a atividade de xilanase determinada.

4.5 Efeito do meio de cultivo sobre a produção de xilanase

Para o estabelecimento do meio de cultivo mais apropriado para a produção de xilanases pelas linhagens IFO-4626 e M-85 de *Penicillium chrysogenum*, foram avaliados dois meios mínimos descritos na literatura como indutores de atividade de xilanase por espécies de *Penicillium*. No presente estudo, o meio descrito por Ferreira (1999) para *Penicillium griseoroseum* foi denominado MMF e meio descrito por Haas et al. (1992) para *Penicillium chrysogenum* foi denominado MMH.

4.6 Efeito do uso de resíduos agroindustriais com fonte de carbono sobre a produção de xilanase

Para estudar o efeito do uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono na produção de xilanases pela linhagem IFO-4626, foi usado como controle inicial o Meio Mínimo Ferreira (MMF). Todos os outros meios de cultivo analisados para produção de xilanase continham os sais do MMF, porém com outra fonte de carbono na concentração de 2% (p/v), sendo estas: palha de trigo, fibra de coco e casca de arroz. A determinação da atividade de xilanase foi feita 72h após o inóculo.

4.7 Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de xilanase

Inicialmente, foram estudados os tempos de 24h, 48h e 72h para as duas linhagens nos meios de cultivo MMF e MMH. Em análises posteriores, nas quais se manteve somente a linhagem IFO-4626 cultivada no MMF, os frascos de Erlenmeyers foram mantidos de 24h a 144h (sendo feita a análise de atividade enzimática em intervalos de 24 horas) ou 48h a 72h (sendo a análise realizada em intervalos de 6 horas).

Diferentes tempos de cultivo (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) também foram estudados buscando-se a otimização desse parâmetro para produção de xilanase nos meios de cultivo contendo resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

4.8 Efeito de diferentes carboidratos sobre a produção de xilanase

Para avaliar o efeito de diferentes carboidratos na produção de xilanases pela linhagem IFO-4626, usou-se como controle inicial o MMF. Os meios aos quais foram adicionados os diferentes carboidratos a serem avaliados foram compostos com as seguintes substâncias: sais do MMF, mais 0,3%, 0,5% ou 1% (p/v) de glicose, xilose, galactose ou carboximetilcelulose (CMC), com e sem xilana de *oat spelt* P.A. (0,3% p/v). A determinação da biomassa micelial e da atividade de xilanase foi feita 72h após o inóculo.

4.9 Determinação da massa micelial

Para a determinação da biomassa micelial produzida nos diferentes meios e tempos de cultivo, a filtração dos meios foi feita através de papel de filtro previamente tarado, sendo a secagem feita em estufa a 55°C até peso constante.

4.10 Determinação da atividade de xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pela dosagem de açúcar redutor como descrito por Miller (1959), usando D-xilose como padrão. A mistura de reação foi constituída de 1,5 mL de substrato (preparado a partir de xilana de *oat spelt* (SIGMA), 1% (p/v) diluída em solução tampão fosfato 50 mM pH 5,5) e 0,5 mL de filtrado de cultura diluído convenientemente quando necessário. A mistura de reação foi mantida em banho-maria a 40°C, por 20 minutos. Alíquotas de 0,25 mL da mistura da reação foram transferidas para tubos contendo 1mL de DNS e 0,75 mL de água destilada, que, em seguida, foram fervidos por 5 minutos e colocados imediatamente em banho de gelo por 5 minutos. Antes de se iniciar a leitura em espectrofotômetro a 540nm, todas as amostras tiveram seus volumes aferidos para 10 mL, mediante acréscimo de 8 mL de água destilada. O controle da reação foi feito pela adição da mistura de reação ao reagente DNS no tempo zero. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μ mol de xilose por minuto nas condições padrões do ensaio.

4.11 Determinação da atividade de celulases

A atividade da celulase foi determinada pela dosagem de açúcar redutor como descrito por Miller (1959), usando glicose como padrão. Tiras de papel de filtro (6x1cm) constituíram o substrato que foi adicionado a 4 mL do filtrado da cultura. Após 90 minutos, a 40°C, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, sendo transferida para tubos contendo 1 mL de DNS e 0,5 mL de água destilada. Em seguida, os tubos foram fervidos por 5 minutos e colocados imediatamente em banho de gelo por 5 minutos. Antes de se iniciar a leitura em espectrofotômetro a 540nm, todas as amostras tiveram seus volumes aferidos para 10 mL, mediante acréscimo de 8 mL de água destilada. O controle da reação foi feito pela adição da mistura de reação ao reagente DNS no tempo zero.

4.12 Determinação de proteína total

A dosagem de proteína extracelular, para cálculo da atividade específica nos filtrados de cultura, foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.13 Purificação das xilanases

Todos os procedimentos de purificação foram realizados a 4°C. Antes da concentração com sulfato de amônio, o filtrado de cultura foi centrifugado a 13000g por 30 min a 4°C para retirada de impurezas.

Inicialmente, foi realizado um fracionamento com sulfato de amônio usando a seguinte seqüência de saturação: 0-30%; 30-50%; 50-70% e 70-90%.

Nos experimentos que se seguiram, o filtrado de cultura foi saturado com 0-90% de sulfato de amônio e mantido em agitação *overnight*. A amostra foi precipitada através de centrifugação a 13000g por 30 min a 4°C. O *pellet* formado foi ressuspensionado com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. Para a dessalinização, foram testados o uso de uma coluna Sephadex G-25 equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 e também a dessalinização através de diálise. Para tanto, o *pellet* ressuspensionado (aproximadamente 40mL) foi dialisado contra dois litros de

tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 durante 24 horas (4 trocas). Após a diálise, a amostra foi centrifugada novamente a 13000g por 10 min a 4°C.

A amostra dialisada foi cromatografada em uma coluna de troca aniônica de DEAE-Sephacel (2,5 cm x 8 cm) e a eluição foi realizada de cinco formas em um fluxo médio de 1mL/min:

- a) Gradiente linear de 0 a 1000 mM de NaCl. Foram coletados 4 mL/tubo;
- b) Eluição do tipo *step-wise* (200, 400, 600, 800 e 1000 mM de NaCl). Foram coletados 10 mL/tubo;
- c) Eluição do tipo *step-wise* (250 e 1000 mM de NaCl). Foram coletados 5 mL/tubo.
- d) Eluição do tipo *step-wise* (100, 250 e 1000 mM de NaCl). Foram coletados 5 mL/tubo.
- e) Eluição do tipo *step-wise* (100 e 1000 mM de NaCl). Foram coletados 5 mL/tubo.

A fração não ligante foi obtida pela lavagem da coluna com o mesmo tampão da diálise (2 vezes o volume da coluna) em um fluxo médio de 1mL/min. Nas eluições do tipo *step-wise* foi utilizado um volume de solução de NaCl correspondente a 2 vezes o volume da coluna, com exceção do item e, onde para a concentração de 100mM de NaCl foi usado um volume de solução de 3 vezes o volume da coluna.

4.14 Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular

As massas moleculares das xilanases, parcialmente purificadas através de cromatografia de troca iônica, foram estimadas utilizando-se coluna Sephacryl S-200 26/60 (320mL), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 adicionado de 100 mM de NaCl. Tanto os padrões quanto as xilanases foram diluídos para um volume de 3,2 mL no mesmo tampão usado para equilibrar a coluna, porém adicionando-se 5% de glicerol. A eluição foi realizada em um fluxo de 1,3 mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL/tubo. As proteínas β -amilase (200 kDa), Álcool desidrogenase (150 kDa), Soroalbumina bovina (66 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa) e Citocromo C (12,4 kDa) foram utilizadas como padrões.

Para a determinação da massa molecular das xilanases I e II foi construído um gráfico, estando no eixo da abscissa os valores de V_e/V_o (onde V_e = volume de eluição de cada proteína e V_o = o volume de vazio, medido através do azul de dextrana) e no eixo da ordenada o logaritmo das massas moleculares.

4.15 Eletroforese (em sistema desnaturante e em sistema não-desnaturante)

A metodologia de eletroforese em sistema desnaturante, descrita por Laemmli (1970), foi utilizada para acompanhamento do estado de purificação da enzima, utilizando-se gel de concentração fixa a 10% de acrilamida.

Os experimentos de eletroforese em sistema não desnaturante foram realizados para comparação do padrão de bandas com os experimentos em sistema desnaturante.

4.16 Determinação do pH e da temperatura ótima de reação

Para determinação da temperatura ótima de reação, o complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura e as xilanases parcialmente purificadas foram incubados em temperaturas variando de 20°C a 65°C em intervalos de 5°C, na presença de substrato como descrito no item 4.10.

Para a determinação do pH ótimo para a reação, o complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura e as xilanases parcialmente purificadas foram incubados à temperatura de 40°C por 20 min como descrito no item 4.10, na presença de substrato diluído em tampão McIlvaine para valores de pH de 3,0 a 8,0 ou tampão glicina-NaOH para valores de pH de 8,5 a 11,0.

4.17 Determinação da estabilidade em diferentes valores de pH

A estabilidade a diferentes valores de pH do complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas foi avaliada em pH de 3,0 a 11,0 com variação de 0,5 em 0,5. As amostras contendo enzima foram misturadas com o tampão no pH desejado na proporção 1:1, enzima: tampão (v/v). O tampão McIlvaine foi utilizado para valores de pH de 3,0 a 8,0 e o tampão glicina-NaOH para valores de pH de 8,5 a 11,0. Após 24h de incubação à temperatura de 25°C, a atividade residual de xilanase foi determinada conforme descrito no item 4.10.

4.18 Determinação da estabilidade térmica

A estabilidade térmica do complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura e das xilanases parcialmente purificadas foi avaliada através da incubação das amostras contendo enzimas na ausência de substrato a 40°C por 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 e 270 min, a 50°C por 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min e a 60°C por 1, 2, 3, 4 e 5 min. Decorrido o tempo de incubação a atividade residual de xilanase foi determinada conforme descrito no item 4.10. As meias vidas ou $T_{1/2}$ nas diferentes temperaturas foram estimadas por meio de curvas da porcentagem da atividade residual contra o tempo de incubação.

4.19 Efeito de íons metálicos e reagentes na atividade de xilanase

O efeito de potenciais ativadores e inibidores da atividade de xilanase foi avaliado pela incubação das enzimas purificadas e do filtrado de cultura à temperatura de 40°C por 20 min, como descrito no item 4.10, na presença de substrato diluído em tampão fosfato de sódio 50mM pH5,5, mais as seguintes substâncias na concentração de 10 mM: acetato de chumbo ((CH₃COO)₂.Pb.3H₂O), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloreto de amônio (NH₄Cl), cloreto de bário (BaCl₂.2H₂O), cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), cloreto de cobalto (CoCl₂.6H₂O), cloreto de cobre (CuCl₂), cloreto de mercúrio (HgCl₂), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), sulfato de ferro (FeSO₄.7H₂O), sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), sulfato de manganês (MnSO₄.7H₂O), sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O).

4.20 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ do complexo xilanolítico e das xilanases purificadas foram estimados, conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934). Para tanto, as enzimas foram incubadas juntamente com concentrações de 5 a 20 mg/mL do substrato xilana de *oat spelt* e a atividade enzimática foi determinada após 20 min de reação em banho-maria a 40°C conforme procedimento descrito no item 4.10

4.21 Determinação de açúcares neutros

Para a determinação do conteúdo de açúcares neutros das xilanases purificadas foi utilizada a metodologia do fenol-ácido sulfúrico, proposta por Dubois et al. (1956). Aliquotas de 1 mL das enzimas puras foram misturadas a 1 mL de água destilada, adicionando-se em seguida 1 mL de solução aquosa de fenol 5% (m/v) e rapidamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi deixada por 10 min à temperatura ambiente, sendo logo em seguida homogeneizada e colocada em banho-maria a 30°C por 15 min. Após esse período, foi feita a leitura de absorbância a 490nm. A curva padrão foi feita utilizando-se solução de glicose.

4.22 Obtenção e preparo do pseudocaule da bananeira

Pseudocaulos de bananeira provenientes de plantas das quais já se tinham colhidos os frutos, localizados no departamento de Genética – ESALQ/ USP em Piracicaba/SP, foram retirados do bananal em dezembro de 2006 e em julho de 2007, através de corte como descrito em Garavello (1999). Após o corte, o pseudocaule foi cortado em pedaços e seco em estufa com circulação de ar a 50°C, sendo estocados após secos em sacos de polietileno. Esse material foi utilizado nos experimentos para branqueamento enzimático após tratamento de pré-hidrólise e polpação kraft.

4.23 Pré-hidrólise do pseudocaule da bananeira

As fibras utilizadas na polpação kraft foram isoladas através de uma pré-hidrólise realizada somente com água, em autoclave rotativa de oito cápsulas (Regmed) com aquecimento elétrico. Conforme sugerido por Silva (1998) as condições para a pré-extração aquosa foram: relação licor/pseudocaule = 6/1, temperatura máxima = 120°C, tempo até a temperatura = 45 min, tempo à temperatura (cozimento) = 60 min.

Após o cozimento, o licor foi recolhido para determinação do pH e teor de sólidos. O material hidrolisado foi desintegrado em liquidificador industrial por 1 min e descarregado em caixa de aço inox com tela de 150 mesh. A fração fibrosa foi obtida após separação do material mucilaginoso em depurador laboratorial com placa de abertura de 0,02 mm. Após secar ao ar, a

fração fibrosa teve seu rendimento determinado, foi acondicionada em saco de polietileno e usada posteriormente para polpação kraft.

4.24 Polpação kraft

Para a polpação kraft foi utilizada a fração fibrosa obtida após a pré-hidrólise do pseudocaule da bananeira descrita no item 4.23, utilizando-se o mesmo digestor da pré-hidrólise.

Inicialmente foi feita uma curva de álcali ativo com as concentrações de álcali (NaOH) de 16, 18, 20 e 22% e as seguintes condições, sugeridas por Silva (1998): sulfidez = 25%, relação licor/ material = 5/1, temperatura máxima = 170°C, tempo até a temperatura = 90 min, tempo à temperatura (cozimento) = 60 min.

O material utilizado para tratamento enzimático foi obtido após polpação kraft nas condições descritas acima, utilizando um álcali a 16%.

Após a polpação, o licor foi recolhido para determinação do pH e teor de sólidos. A massa celulósica foi desintegrada em liquidificador industrial por 2 min e descarregada em tela com abertura de 150 mesh. A suspensão fibrosa não foi depurada quando se fez a curva de álcali ativo, já que não foram observados rejeitos do cozimento. Porém, quando a polpação foi realizada com maior quantidade de material, em um álcali a 16%, foi necessário depurar a suspensão fibrosa em depurador laboratorial com abertura de 0,02 mm, sendo determinados o rendimento bruto e depurado da amostra.

4.25 Determinação do número Kappa

O número Kappa foi determinado conforme norma TAPPI T236 cm-85 (1998), sendo expresso como a quantidade (mL) de uma solução 0,1 N de KMnO_4 consumida por 1 g de polpa absolutamente seca.

4.26 Tratamento enzimático da polpa de pseudocaule de bananeira

A polpa de pseudocaule de bananeira, obtida como descrito no item 4.24, com número Kappa de 21,9 teve seu pH ajustado para 5,0 através de lavagens sucessivas em água e adição de H₂SO₄ 0,1N.

As xilanases presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* e as xilanases purificadas I e II foram adicionadas à polpa nas seguintes concentrações: 2,5; 5,0; 10 e 25 U/ g de polpa absolutamente seca, mantendo-se a polpa em uma consistência de 5%. Como controle foi adicionada água destilada em substituição às enzimas. As diferentes xilanases ou água foram misturadas à polpa em sacos de polietileno (tipo *Zip Lock*) e colocadas em banho-maria a 40°C por 3,5 h. A mistura do conteúdo do saco de polietileno foi realizada a cada 30 min através de pressão manual intermitente do saco de polietileno.

Decorrido o tempo de tratamento, o filtrado obtido através de passagem da polpa em saco de tecido com abertura de 150 mesh teve a quantidade de açúcares redutores determinados como descrito no item 4.10 usando D-xilose como padrão. Após centrifugação a 2000g por 10 min, o filtrado teve o material cromóforo monitorado nos comprimentos de onda de 237nm, 254nm, 280nm e 465nm.

A polpa foi lavada em água destilada e guardada em geladeira para análises posteriores.

4.27 Delineamento experimental e análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com três repetições, exceto os de polpação que foram realizados com duas repetições.

Foi feita análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ou regressão polinomial.

5 Resultados e Discussão

5.1 Efeito da linhagem, meio de cultivo e tempo sobre a produção de xilanase

A linhagem IFO-4626 em relação à linhagem M-85, apresentou uma maior atividade de xilanase no MMF em todos os tempos avaliados, porém no MMH a linhagem M-85 se mostrou superior (Tabela 3). Pallu, Erlo e Molina (2001) evidenciaram a superioridade da linhagem IFO-4626 quando comparada com a linhagem M-85, usando para tanto, o MMF.

Tabela 3 – Atividade de xilanase (U/mL) para as linhagens IFO-4626 e M-85, meios e tempos de cultivo

Tempo (h)	Meio	Linhagem	Atividade de xilanase (U/mL)	5%	1%
24	MMF	IFO-4626	0,147	a	A
		M-85	0,103	a	A
	MMH	M-85	0,480	a	A
		IFO-4626	0,060	a	A
48	MMF	IFO-4626	16,660	a	A
		M-85	14,837	b	A
	MMH	M-85	9,727	a	A
		IFO-4626	0,433	b	B
72	MMF	IFO-4626	20,883	a	A
		M-85	18,593	b	B
	MMH	M-85	20,730	a	A
		IFO-4626	8,527	b	B

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey.
DMS 5% = 1,43155, DMS 1% = 1,94141 e Coeficiente de variação = 9,17%

Os resultados do presente trabalho indicam um possível uso da linhagem M-85 para produção de xilanase quando cultivada em MMH, pois apesar dessa linhagem não ter sido superior à IFO-4626, alcançou altos índices de atividade enzimática no MMH no tempo de 72h

(Figura 2). A linhagem M-85 é uma mutante da linhagem IFO-4626 selecionada por sua expressiva produção de pectinases (MOLINA; PELISSARI; VITORELLO, 2001), assim seu uso também para produção de xilanases contribuirá para o emprego de ambos os sistemas enzimáticos no processamento de fibras celulósicas.

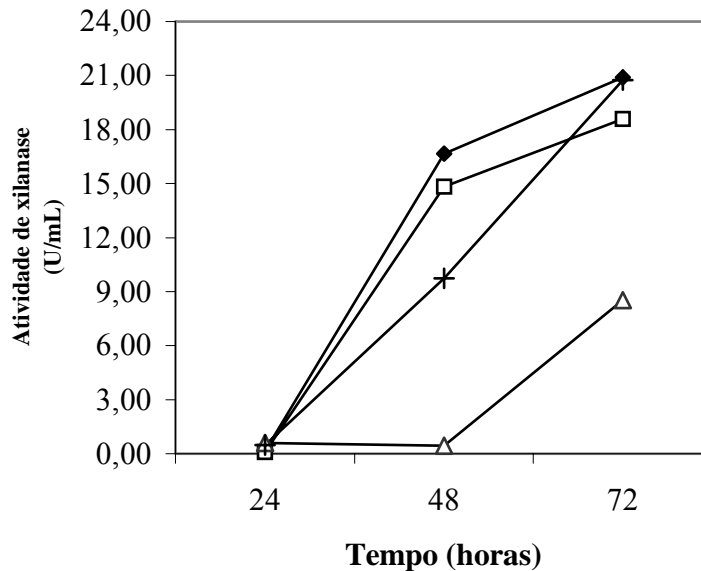


Figura 2 – Influência do meio e tempo de cultivo na atividade de xilanase das linhagens IFO-4626 e M-85 de *P. chrysogenum*. (◆) Linhagem IFO-4626 cultivada no MMF; (□) Linhagem M-85 cultivada no MMF; (Δ) Linhagem IFO-4626 cultivada no MMH; (+) Linhagem M-85 cultivada no MMH

Para purificação de xilanases, Haas et al. (1992) utilizou a linhagem Q 176 de *P. chrysogenum* cultivada no MMH por 48h a 25°C, sendo a atividade de xilanase no filtrado de cultura similar à encontrada no presente trabalho, porém com a utilização do MMF.

Observando a Figura 2, nota-se que tanto a linhagem IFO-4626 como a linhagem M-85, só produziram xilanase em quantidade significativa após 24h de cultivo em ambos os meios estudados, sendo que a linhagem IFO-4626 cultivada no MMH, mesmo em 48h não apresentou atividade de xilanase. A atividade residual de xilanase em 24h também foi relatada por Medeiros et al. (2000), que mostraram também uma atividade relevante de xilanase somente após o segundo dia de cultivo, o que sugere um mecanismo indutivo. As duas linhagens no MMF e a linhagem IFO-4626 no MMH tiveram um ajuste significativo dos dados a uma regressão linear

($P. > F = 0,00001$), indicando que houve uma tendência significativa de aumento da atividade de xilanase durante o período do experimento. Entretanto, as duas linhagens no MMF apresentaram um ajuste altamente significativo a uma regressão quadrática ($P. > F = 0,00001$), indicando uma tendência a estabilizar o nível de atividade nas condições estudadas, após 48h; enquanto que o ajuste quadrático ($P. > F = 0,00002$) da IFO-4626, no meio MMH, indicou que entre 24h e 48h não houve diferença significativa nos níveis de atividade, sendo que esta atividade só começou a aumentar efetivamente após as 48h de cultivo. Para a linhagem M-85 no MMH os dados foram ajustados somente a uma regressão linear, apresentando também aumento de atividade entre o início e o final do período do experimento. Ainda na Figura 2, pode-se observar a superioridade do MMF em 48h, ocorrendo um acréscimo da atividade enzimática em 72h, por isso optou-se por um estudo mais detalhado de tempo de cultivo nesse meio, usando para tanto a linhagem IFO-4626 que se mostrou superior (Tabela 3).

Nesse experimento mais detalhado, após 48h de cultivo no MMF, a linhagem IFO-4626 teve um pequeno acréscimo na atividade enzimática até 120h, havendo um decréscimo de 120h a 144h, os ajustes dos dados foram altamente significativos ($P. > F = 0,00292$) em uma regressão de grau 4 (Figura 3 (a)), indicando alterações significativas na atividade entre todos os tempos estudados. Fazendo a análise da atividade enzimática em intervalos de 6 em 6h, percebe-se que após 60h o incremento na atividade enzimática é muito pequeno e de 66h a 72h há inclusive um decréscimo na atividade de xilanase (Figura 3 (b)), a equação de regressão apresenta um ajuste quadrático ($P. > F = 0,00677$). Pallu e Molina (2003) relataram que 72h foi o tempo de cultivo que melhor induziu a atividade de xilanase para todas as linhagens analisadas, incluindo a IFO-4626, já Haas et al. (1992) usou o tempo de cultivo de 48h para a linhagem Q 176, porém utilizando o MMH. Entretanto, a influência do tempo de cultivo para produção de xilanases varia muito entre as linhagens, para *Aspergillus niger* e *A. terreus* o melhor tempo foi de 4 dias (GAWANDE; KAMAT, 1999) e para *A. versicolor* foi de 5 dias (CARMONA et al., 1997). Abdel-Sater e Said (2001) observaram que para *Trichoderma harzianum* a maior produção de xilanase foi alcançada após 8 dias de cultivo.

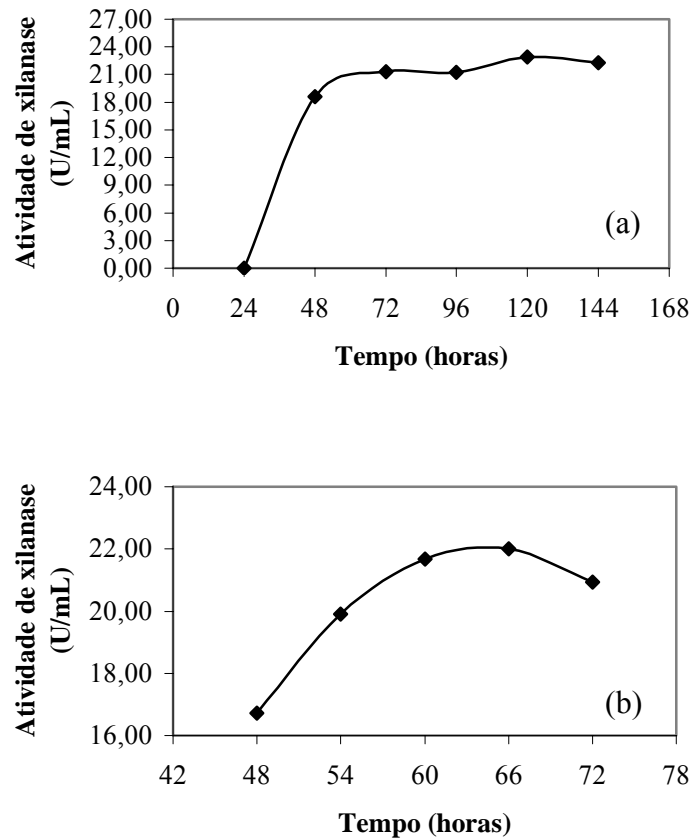


Figura 3 - Efeito do tempo de cultivo na atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* em MMF. (a) A atividade de xilanase foi determinada em um período de 24h a 144h em intervalos de 24h. (b) A atividade de xilanase foi determinada em um período de 48h a 72h em intervalos de 6h

A otimização do tempo de cultivo e seleção de linhagens que produzam alta quantidade de enzima em um menor período de tempo pode contribuir para viabilizar o uso dessas enzimas em uma escala industrial, uma vez que reduz o tempo de produção, o que conseqüentemente minimiza os custos.

A biomassa seca microbiana da linhagem IFO-4626 produzida no MMH foi estatisticamente superior àquela produzida no MMF em todos os tempos de cultivo, já a atividade de xilanase apresentou comportamento inverso, sendo superior no MMF (Tabela 4). Observando a Figura 4, observa-se no MMF uma pequena variação da biomassa microbiana no decorrer do tempo, mas essa variação na produção de biomassa é acompanhada pela variação na atividade de

xilanase, onde em 72h há uma maior atividade enzimática e maior biomassa seca e em 96h há uma queda de ambos os parâmetros. Já no MMH enquanto os dados de biomassa seca são ajustados estatisticamente por uma regressão quadrática ($P. > F = 0,00398$), a atividade de xilanase é ajustada por uma regressão linear ($P. > F = 0,00592$), assim em 96h apesar de ocorrer uma queda da biomassa seca, há um aumento significativo da atividade de xilanase.

Tabela 4 – Teste de Tukey para as médias de massa seca (g) e atividade de xilanase (U/mL) para diferentes meios e tempos de cultivo da linhagem IFO-4626

Tempo (h)	Meio	Massa seca (g)			Atividade de xilanase (U/mL)		
		Média (1)	5%	1%	Média (2)	5%	1%
24	MMF	0,043	a	A	0,000	a	A
	MMH	0,097	b	B	0,013	a	A
48	MMF	0,047	a	A	21,788	a	A
	MMH	0,157	b	B	0,594	b	B
72	MMF	0,060	a	A	23,694	a	A
	MMH	0,173	b	B	4,357	b	B
96	MMF	0,053	a	A	17,848	a	A
	MMH	0,170	b	B	3,798	b	B

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey.

⁽¹⁾ DMS 5% = 0,02806, DMS 1% = 0,03863 e Coeficiente de variação = 16,20%.

⁽²⁾ DMS 5% = 3,19304, DMS 1% = 4,39576 e Coeficiente de variação = 20,46%.

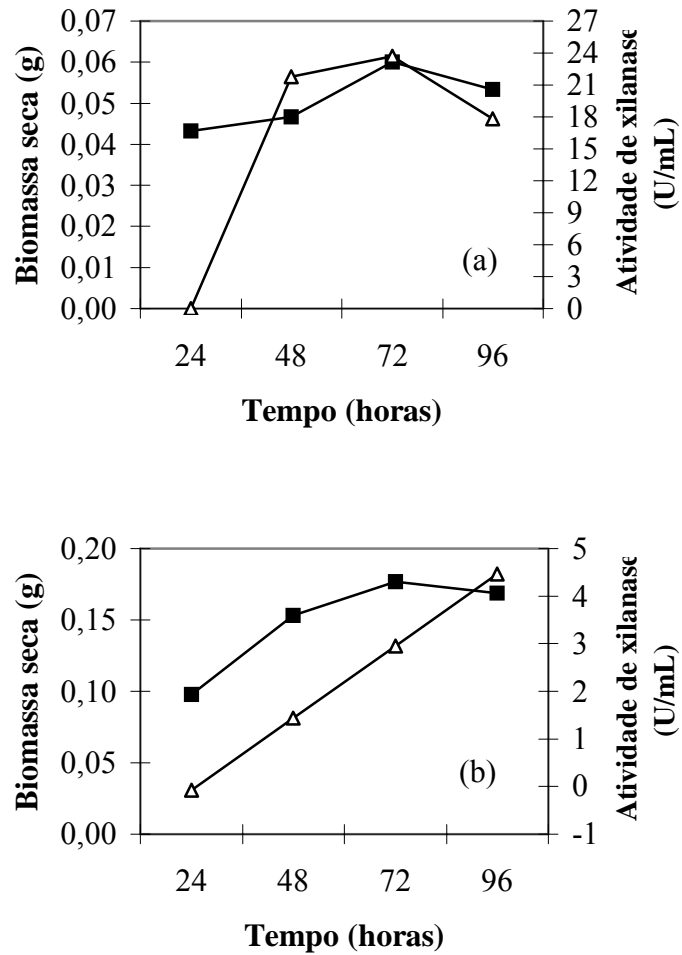


Figura 4 - Efeito do tempo de cultivo na produção de massa seca (■) e na atividade de xilanase (Δ) da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* cultivada em diferentes meios. (a) MMF; (b) MMH (1992)

5.2 Efeito do uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono e do tempo sobre a produção de xilanase

A linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* já foi bem caracterizada em nosso laboratório para a produção de xilanases, sendo obtida alta atividade xilanólítica dessa linhagem em meio mineral contendo xilana de *oat spelt* P.A. (PALLU; ERLO; MOLINA, 2001), esses resultados foram confirmados no presente estudo (item 5.1). Como se pode observar na Tabela 5, a palha de cana-de-açúcar, bem como as fibras de coco, podem ser usadas em substituição à xilana de *oat spelt* P.A., uma vez que as médias de atividade xilanólítica obtidas não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade. Esse resultado é interessante, uma vez que a produção de xilanases em resíduos agroindustriais contribui para a redução do custo de produção dessas enzimas, o que pode viabilizar o uso dessa enzima no processamento de fibras e polpas celulósicas.

Tabela 5 - Atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono

Fonte de Carbono	Atividade de xilanase (U/mL) (1)	5%	1%
MMF	6,446	a	A
Palha de Cana (2%)	6,437	a	A
Fibra de Coco (2%)	5,531	a	A B
Casca de Arroz (2%)	2,997	b	B

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey.

DMS 5% = 2,24018, DMS 1% = 3,06604 e Coeficiente de variação = 16%

(1) Valores transformados segundo $\sqrt{x+1}$

De acordo com a Tabela 5, a casca de arroz foi o substrato menos eficiente para a indução da atividade de xilanase. Muitos fatores podem interferir na eficiência da hidrólise enzimática. Em estudo sobre a hidrólise enzimática da casca de arroz utilizando celulasas Reyes, Peralta-Zamora e Durán (1998) evidenciaram a importância da realização de pré-tratamentos químicos ou fotoquímicos para a deslignificação desse material antes da utilização de enzimas.

Com relação à eficiência das enzimas xilanolíticas, essas apresentam maior atividade quando têm por substrato xilana polimérica e sua taxa de reação de hidrólise normalmente

diminui com o decréscimo do comprimento da cadeia de substratos oligoméricos. Elas não hidrolisam xilobiose e a hidrólise de xilotriose é na maioria dos casos insignificante ou ao menos limitada. Dos produtos finais, a xilotriose já foi relatada como inibidora da ação de xilanases (BIELY, 1985).

Assim, em função dos muitos compostos que podem ter sido formados durante a esterilização em autoclave da casca de arroz antes do inóculo do fungo ou posteriormente à reação enzimática e da estrutura e composição química dos compostos presentes nesse substrato, não se esclareceu no presente trabalho, os motivos que levaram à baixa indução de xilanases quando se empregou casca de arroz como fonte de carbono.

Na Tabela 6 se observa baixa atividade de xilanase no tempo de 24h em todos meios estudados, com aparecimento de atividade de xilanase relevante somente após 48h de cultivo, o que sugere um mecanismo indutivo. Em todos os tempos de cultivo estudados, após 24h, o meio contendo palha de cana-de-açúcar se mostrou superior aos demais em relação à indução de atividade de xilanase, sendo ainda o meio contendo fibra de coco estatisticamente superior ao que continha casca de arroz.

Analisando a Figura 5, observa-se um aumento linear no decorrer do tempo da produção de xilanase no meio com casca de arroz e também um aumento significativo na atividade de xilanase no meio com fibra de coco no tempo de 96h a 120h. Esses resultados sugerem uma possível dificuldade na hidrólise enzimática desses substratos por essa linhagem de *P. chrysogenum*, possivelmente devido às estruturas e composições desses materiais; no meio com palha de cana-de-açúcar em 48h já se atingiu uma atividade superior à máxima encontrada no meio com casca de arroz e em 72h uma atividade superior à máxima encontrada no meio com fibra de coco.

Tabela 6 – Atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 em diferentes meios e tempos de cultivo

Tempo (h)	Fonte de Carbono	Atividade de xilanase		
		(U/mL) (1)	5%	1%
24	Fibra de Coco	1,556	a	A
	Palha de Cana	1,001	a	A
	Palha de Arroz	1,000	a	A
48	Palha de Cana	5,938	a	A
	Fibra de Coco	3,890	b	B
	Palha de Arroz	1,013	c	C
72	Palha de Cana	8,928	a	A
	Fibra de Coco	4,297	b	B
	Palha de Arroz	1,701	c	C
96	Palha de Cana	10,085	a	A
	Fibra de Coco	4,695	b	B
	Palha de Arroz	2,223	c	C
120	Palha de Cana	10,290	a	A
	Fibra de Coco	6,865	b	B
	Palha de Arroz	2,787	c	C

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey.

DMS 5% = 1,51694, DMS 1% = 1,93855 e Coeficiente de variação = 17,04%

(1) Valores Transformados segundo $\sqrt{x+1}$

O maior tamanho da fibra de coco que só foi cortada em pedaços, quando a palha de cana-de-açúcar foi moída, deve ter contribuído para a diferença entre esses substratos em relação à atividade enzimática. Na Figura 5 pode-se observar que após 96h de cultivo no meio com palha de cana-de-açúcar o incremento na atividade de xilanase foi muito pequeno. Em estudo onde se cultivou o fungo *Aspergillus niger* KK2 em meio contendo palha de arroz, observou-se em uma fermentação em estado sólido, máxima atividade de xilanase em 4 dias de cultivo (KANG et al., 2004). A linhagem A-151 de *Streptomyces actuosus* apresentou alta atividade de xilanase em meio mineral suplementado com 5% de farelo de arroz, com máxima atividade em 4 dias de cultivo. Porém, os níveis de atividade de xilanase foram maiores quando se adicionou a esse meio (com 5% de farelo de arroz), 1% de palha de arroz ou 1% de pó de conchas de caranguejo e

camarão (SCSP) ou 0,5% de cascas de laranja. Entretanto, com a adição de SCSP e cascas de laranja a atividade máxima foi obtida com 6 dias de incubação (WANG et al., 2003).

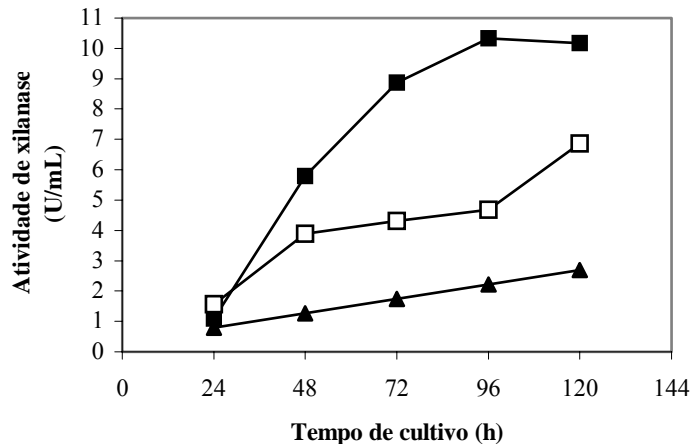


Figura 5 - Influência do meio e tempo de cultivo na atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*. (■) Palha de Cana; (□) Fibra de Coco; (▲) Casca de Arroz

5.3 Efeito de diferentes carboidratos na atividade de xilanase e biomassa micelial

O crescimento da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* não foi afetado pela substituição no MMF da xilana de *oat spelt* (0,3%) por glicose, xilose ou galactose nessa mesma concentração, uma vez que não foi encontrada diferença significativa ($\alpha = 0,05$) dos meios com esses carboidratos na concentração de 0,3% em relação ao meio controle (MMF) (Tabela 7).

Pela Tabela 7 também se observa que os únicos meios que diferiram do controle ($\alpha = 0,05$), devido a uma maior biomassa micelial, foram os que continham maior quantidade de carboidrato (glicose, xilose e galactose 1%). Entretanto, 0,5% de glicose também estimulou um maior desenvolvimento da linhagem estudada em relação ao MMF, mas a maior massa micelial foi obtida no meio com 1% de glicose.

Glicose, xilose e manose também foram favoráveis para o crescimento de *Streptomyces galbus*, porém não induziram atividade enzimática desse organismo (KANSOH; NAGIEB, 2004).

A linhagem IFO-4626 é conhecida por não apresentar atividade celulotítica (MOLINA; PELISSARI; VITORELLO, 2001), o que explica seu crescimento apenas residual nos meios contendo como única fonte de carbono CMC (Tabela 7). A biomassa micelial formada nesses meios com ausência de outra fonte de carbono, a não ser CMC, deve-se provavelmente à quantidade de extrato de levedura adicionada aos meios.

Tabela 7 – Biomassa micelial da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1% e não se adicionou xilana de *oat spelt*

Carboidrato/ Concentração	Biomassa Micelial (g)	5%⁽¹⁾	1%⁽¹⁾
Glicose 1%	0,22	a	A
Glicose 0,5%	0,16	b	B
Xilose 1%	0,13	b c	B C
Galactose 1%	0,13	b c	B C
Xilose 0,5%	0,12	b c d	B C
Galactose 0,5%	0,10	c d	B C
Glicose 0,3%	0,10	c d	B C
Xilose 0,3%	0,09	c d	C
Galactose 0,3%	0,09	c d	C
Controle (MMF)	0,08	d	C D
CMC 0,5%	0,02	e	D
CMC 0,3%	0,02	e	D
CMC 1%	0,02	e	D

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado. Coeficiente de variação = 16,621%

Por outro lado, pode se constatar pela análise da Tabela 8, que a adição de CMC ao meio contendo xilana de *oat spelt* não inibe o crescimento da linhagem IFO-4626, uma vez que a biomassa fúngica observada no MMF (controle) é a mesma observada quando se adicionou neste meio diferentes concentrações de CMC. Ambos os resultados indicam que esse composto de fato não participa do metabolismo celular da linhagem em estudo.

Da mesma forma que observado nos meios onde não se adicionou xilana de *oat spelt* (Tabela 7), os meios com xilana de *oat spelt* mais outra fonte de carboidrato produziram maior biomassa fúngica quando maior quantidade de carboidrato estava presente, sendo observada maior massa micelial no meio com 1% de glicose (Tabela 8).

A Figura 6 ilustra as curvas de regressão originadas para as diferentes concentrações de cada carboidrato analisado. Na Figura 6(a) as equações para a glicose, xilose e galactose foram ajustadas por uma equação linear, respectivamente $\text{Prob.}>F=0,00001$, $0,00628$ e $0,00408$, sugerindo que se maiores concentrações desses carboidratos fossem usados maior biomassa seria produzida. Nessa mesma Figura observa-se que não ocorreu incremento da biomassa com o aumento da concentração de CMC ($\alpha = 0,05$).

Quando se adicionou diferentes concentrações de glicose, xilose, galactose ou CMC ao MMF que contém 0,3% de xilana de *oat spelt*, menores diferenças em relação à biomassa produzida foram observadas entre os meios com 0,3% e 0,5% de glicose, xilose e galactose. Porém, a adição de 1% desses carboidratos determinou que o meio com 1% de glicose, diferisse dos meios com 1% de xilose ou 1% galactose (Tabela 8). Mesmo sem diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$), o meio com 1% de xilose produziu maior biomassa que o meio com 1% de galactose, sendo que esse último teve sua regressão ajustada para uma regressão quadrática ($\text{prob.}>F=0,00109$) indicando uma possível inibição do crescimento da linhagem IFO-4626 quando se aumenta a quantidade de galactose para níveis acima de 0,5% e se mantém em 0,3% a concentração de xilana de *oat spelt* (Figura 6(b)).

Tabela 8 – Biomassa micelial da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou 0,3% de xilana de *oat spelt* e diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%

Carboidrato/ Concentração	Biomassa Micelial (g)	5%⁽¹⁾	1%⁽¹⁾
MMF + Glicose 1%	0,26	a	A
MMF + Xilose 1%	0,22	b	A B
MMF + Glicose 0,5%	0,21	b	A B
MMF + Galactose 0,5%	0,20	b c	A B C
MMF + Xilose 0,5%	0,19	b c	B C
MMF + Galactose 1%	0,19	b c	B C
MMF + Xilose 0,3%	0,16	c	C
MMF + Galactose 0,3%	0,15	c	C
MMF + Glicose 0,3%	0,15	c	C
Controle (MMF)	0,07	d	D
MMF + CMC 1%	0,07	d	D
MMF + CMC 0,3%	0,07	d	D
MMF + CMC 0,5%	0,07	d	D

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado. Coeficiente de variação = 9,116%

As regressões para as concentrações de glicose e xilose adicionadas ao MMF foram ajustadas de forma linear, respectivamente $\text{prob.} > F = 0,00001$ e $0,00011$ (Figura 6(b)). Da mesma forma que se observou na Figura 6(a), onde os meios não tinham xilana de *oat spelt*, na Figura 6(b), onde em todos os meios foram adicionados 0,3% de xilana de *oat spelt*, não ocorreu incremento da biomassa com o aumento da concentração de CMC ($\alpha = 0,05$).

Na Figura 6, pode se observar que nos meios com xilana de *oat spelt* (Figura 6(b)), maior biomassa foi produzida em relação aos meios sem xilana de *oat spelt* (Figura 6(a)), isso devido à maior concentração total de carboidrato nos meios com xilana.

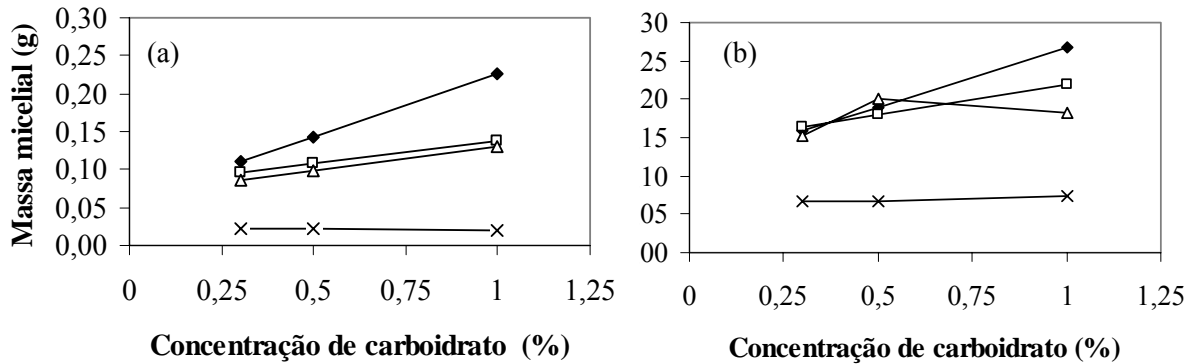


Figura 6 – Biomassa micelial⁽¹⁾ da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) com diferentes carboidratos (glicose (♦), xilose (□), galactose (Δ) ou carboximetilcelulose (X) nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%). (a) sem xilana *oat spelt*, (b) com xilana *oat spelt* no meio de cultura

⁽¹⁾ Valores ajustados por equações de regressão

As concentrações de glicose, galactose e CMC, utilizadas no presente estudo, não induziram atividade de xilanase da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*, quando usadas no meio como única fontes de carbono (Tabela 9). Já para β -D-xilosidase de *Humicola grisea*, Almeida et al. (1995), constataram que celulose microcristalina (Avicel) e carboximetilcelulose foram bons indutores, enquanto glicose, maltose, celobiose, manitol, amido e sacarose induziram fracamente a síntese dessa enzima.

A xilose, em todas as concentrações testadas, induziu atividade de xilanase mesmo na ausência de xilana de *oat spelt*. Quando não se adicionou xilana de *oat spelt* ao meio, maiores concentrações de xilose induziram maior atividade de xilanase, porém a maior concentração testada (1%) foi significativamente inferior ($\alpha = 0,05$) ao meio controle, MMF (Tabela 9). Segundo Biely (1985), a xilose, o principal monômero formador da xilana, induz vários processos fermentativos e assim como a xilana é usada como indutora nos estudos de síntese de xilanase obtida biologicamente. Flores et al. (1996) demonstram que a xilose pode ter efeitos contrários na síntese de β -xilosidade e na síntese de endoxilanase por *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Quando usada como única fonte de carbono, a xilose agiu como indutora, porém teve um efeito inibidor quando foi adicionada ao meio que continha xilana de *birchwood*. Os resultados apresentados por Flores et al. (1996) concordam com o do presente estudo, dado que mesmo não

havendo um ajuste significativo dos dados por regressão ($\alpha = 0,05$), pode-se notar uma queda na atividade de xilanase com o aumento da concentração de xilose em presença de 0,3% de xilana de *oat spelt* (Figura 7). O inverso ocorreu quando a xilose foi a única fonte de carbono utilizada (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade de xilanase no filtrado de cultura após cultivo da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1% e não se adicionou xilana de *oat spelt*

Carboidrato/ Concentração	Atividade de xilanase (U/mL)		
	(1)	5% ⁽²⁾	1% ⁽²⁾
Controle (MMF)	63,59	a	A
Xilose 1%	41,05	b	B
Xilose 0,5%	12,30	c	C
Xilose 0,3%	10,00	c	C
Glicose 1%	0,00	d	D
Glicose 0,5%	0,00	d	D
Glicose 0,3%	0,00	d	D
Galactose 1%	0,00	d	D
Galactose 0,5%	0,00	d	D
Galactose 0,3%	0,00	d	D
CMC 1%	0,00	d	D
CMC 0,5%	0,00	d	D
CMC 0,3%	0,00	d	D

⁽¹⁾ Médias originais. Análise feita com transformação das médias segundo $\sqrt{x+1}$

⁽²⁾ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado. Coeficiente de variação = 9,105%

Abdel-Sater e El-Said (2001) relatam que a adição ao meio de cultura de 1% de maltose ou 1% de amido induz alta produtividade de xilanase por *Trichoderma harzianum*, sendo que 1% de glicose, 1% de celulose ou 1% de sacarose também foram favoráveis para a indução de xilanase quando comparadas ao controle (xilana). Os resultados de Abdel-Sater e El-Said (2001)

discordam dos apresentados no presente estudo, onde se constatou que 1% de glicose ou 1% de galactose são repressores da síntese de xilanase de *P. chrysogenum* IFO-4626 (Tabela 10).

Almeida et al. (1995) relatam que a síntese de β -D-xilosidase por *H. grisea* é afetada por repressão catabólica quando o meio de cultura é suplementado com 1% de xilana e 1% de glicose. Esses dados estão de acordo com os de Flores et al. (1996), que mostram que a síntese de β -xilosidase e β -xilanase por *Streptomyces* sp. CH-M-1035 é fortemente reprimida pela adição de 1% de glicose, 1% de glicerol ou 1% de ácido succínico ao meio contendo 1% de xilana de *birchwood*.

Segundo Molina, Pelissari e Vitorello (2001), há evidências que glicose funciona mais como um indutor do que como um inibidor da atividade de pectinase da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. O mesmo não se observou no presente trabalho para a atividade de xilanase dessa mesma linhagem. De acordo com a Tabela 10, níveis de glicose de 0,3% ou 0,5% não agiram nem como indutores, nem como repressores da síntese de xilanase. Porém, tanto 1% de glicose como 1% de galactose, inibiram fortemente a síntese de xilanase (Tabela 10).

Quando adicionadas ao meio contendo xilana de *oat spelt*, todas as concentrações de CMC e xilose e as concentrações de 0,3% e 0,5% de glicose e galactose não diferiram estatisticamente nem entre si e nem em relação ao controle (Tabela 10). Considerando-se um $\alpha = 0,05$, nenhum efeito indutivo foi observado, apesar do incremento em relação ao controle, de aproximadamente 10U/mL quando se adicionou 0,5% de galactose ao meio contendo xilana de *oat spelt* (Tabela 10).

Na Figura 7, pode se observar a queda da atividade de xilanase na concentração de 1% de glicose e galactose, mostrando a inibição da síntese de xilanase nessas concentrações, fato já comentado através da Tabela 10.

As curvas de regressão para esses dois carboidratos ajustaram-se de forma quadrática, respectivamente $\text{prob.} > F = 0,00052$ e $0,00039$, evidenciando, mesmo que não acentuadamente, um aumento na atividade de xilanase da concentração de 0,3% a 0,5% e uma queda de 0,5% a 1%. Para os níveis de xilose e CMC não houve um ajuste significativo dos dados, mostrando que não há diferença estatística ($\alpha = 0,05$) entre as concentrações analisadas. Porém, observando-se a curva para as concentrações de xilose (Figura 7), nota-se uma leve queda após a concentração de 0,5%. Dessa forma, sugere-se novos estudos com maiores concentrações de xilose para se avaliar se haverá inibição da síntese de xilanase pela linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*.

Oliveira, Porto e Tambourgi (2006) estudando a produção de xilanase por *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 em diferentes resíduos agrícolas, encontraram as maiores produtividades de xilanase, quando menores concentrações de açúcares redutores estavam presentes, sugerindo assim que a atividade de xilanase aumenta com a redução na concentração de açúcares redutores.

Tabela 10 – Atividade de xilanase no filtrado de cultura após cultivo da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou 0,3% de xilana de *oat spelt* mais diferentes carboidratos nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%

Carboidrato/ Concentração	Atividade de xilanase (U/mL) ⁽¹⁾	5% ⁽²⁾	1% ⁽²⁾
MMF + Galactose 0,5%	60,00	a	A
MMF + Xilose 0,5%	53,35	a	A
MMF + Galactose 0,3%	52,35	a	A
MMF + Xilose 0,3%	52,28	a	A
MMF + CMC 1%	51,44	a	A
Controle (MMF)	50,54	a	A
MMF + Glicose 0,5%	48,63	a	A
MMF + CMC 0,5%	45,29	a	A
MMF + Glicose 0,3%	45,05	a	A
MMF + CMC 0,3%	44,60	a	A
MMF + Xilose 1%	41,57	a	A
MMF + Galactose 1%	3,37	b	B
MMF + Glicose 1%	0,00	b	B

⁽¹⁾ Médias originais. Análise feita com transformação das médias segundo $\sqrt{x+1}$

⁽²⁾ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância indicado. Coeficiente de variação = 10,496%

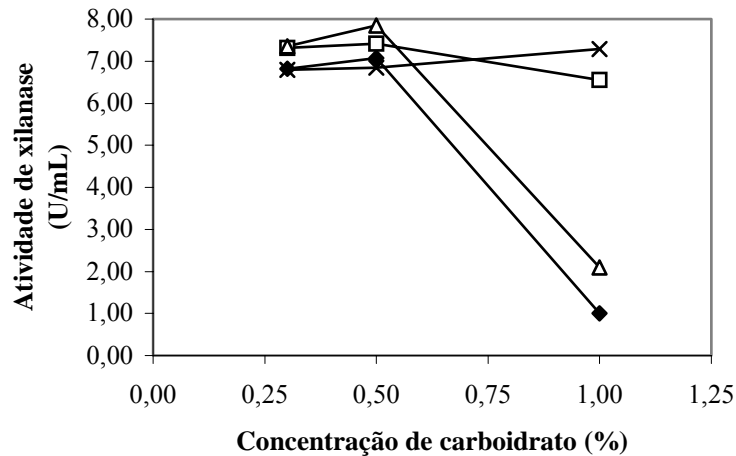


Figura 7 – Atividade de xilanase⁽¹⁾ da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* cultivada por 72h em meio mineral (sais do MMF) onde se adicionou xilana *oat spelt* mais diferentes carboidratos (glicose (◆), xilose (□), galactose (Δ) ou carboximetilcelulose (X)) nas concentrações de 0,3%, 0,5% ou 1%.

⁽¹⁾ Médias transformadas segundo $\sqrt{x+1}$. Valores ajustados por equações de regressão

5.4 Purificação das xilanases

Apesar de ter se encontrado alta atividade de xilanase extracelular nos meios contendo resíduos agroindustriais como fonte de xilana (Tabela 5) e também alta atividade de xilanase produzida pela linhagem M-85 no MMH (Figura 2), a condição de cultivo escolhida para produção e posterior purificação das xilanases de *Penicillium chrysogenum* foi o cultivo da linhagem IFO-4626 por 72h a 25°C no MMF. Essa escolha deve-se à baixa homogeneidade de resultados quando se usa resíduos agroindustriais como indutores e também à alta quantidade de xilana de *oat spelt* (1% p/v) usada no MMH em relação ao MMF (0,3% p/v).

Cabe salientar que apesar da maior atividade de xilanase ter sido obtida em 60h de cultivo da linhagem IFO-4626 no MMF (Figura 3), o tempo de 72h foi o empregado devido a já terem sido feitos experimentos prévios para a purificação antes da otimização do tempo de produção de xilanase.

5.4.1 Fracionamento com sulfato de amônio

O primeiro passo adotado para a purificação de muitas proteínas é o fracionamento, sendo o sulfato de amônio, o sal mais usado para esse fim. Assim, visando uma purificação prévia do filtrado enzimático bruto, foram realizadas precipitações subseqüentes com sulfato de amônio usando diferentes níveis de saturação. Após a adição do sal até o nível de saturação desejado e homogeneização lenta, as amostras foram centrifugadas, porém não foi observada formação de *pellet* nas faixas de saturação de 0-30%, 30-50% e 50-70%. Na faixa de 70-90% de saturação um pequeno *pellet* foi obtido. Na Figura 8 pode ser observado que a atividade de xilanase, no sobrenadante após a precipitação nas faixas de 0-30% e 30-50%, foi mantida em relação ao filtrado. Ainda analisando a Figura 8 observa-se uma pequena queda de atividade de xilanase no sobrenadante após 50% de saturação, indicando ser esse o início da faixa de saturação na qual as xilanases começam a ser precipitadas.

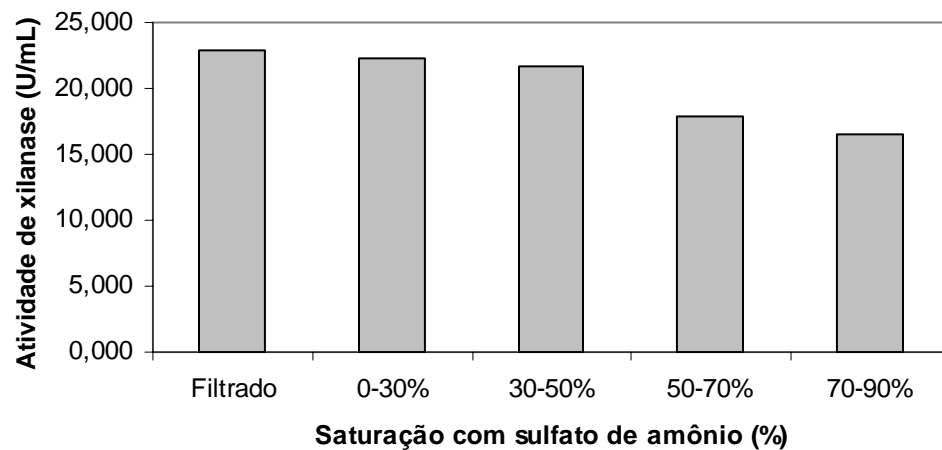


Figura 8 – Atividade de xilanase no sobrenadante após precipitações subseqüentes com sulfato de amônio

Por não ter sido encontrada uma faixa de saturação com sulfato de amônio na qual as xilanases se precipitem, a concentração do filtrado enzimático foi feita com 0-90% de saturação de sulfato de amônio, sendo que após adição completa do sal a amostra ficou *overnight* sob refrigeração de 4°C em agitação, após o que foi centrifugada e o *pellet* obtido foi ressuspendido e

após dessalinização foi eluído em uma coluna com resina de troca aniônica. Esse mesmo procedimento para concentração do filtrado enzimático foi adotado por Haas et al. (1992). Sinitsyna et al. (2003); Saha (2002) usaram uma saturação de 80% de sulfato de amônio (0°C) por 12h para concentrar o filtrado enzimático. Outros autores como Carmona et al. (2005) e Sandrim et al. (2005) não fazem uma concentração prévia do filtrado de cultura; nesses trabalhos o filtrado de cultura é somente dialisado antes de ser aplicado em um sistema de cromatografia.

5.4.2 Dessalinização

Para a dessalinização da amostra foram testados o uso de colunas Sephadex G-25 e o uso de diálise. Como pode ser verificado na Figura 9, ocorreu uma grande perda de atividade de xilanase devido ao uso da coluna Sephadex G-25, sendo recuperada apenas 1,5% da atividade de xilanase em relação ao filtrado de cultura. Já através da diálise uma maior quantidade de xilanase foi recuperada, em torno de 40% (Figura 9).

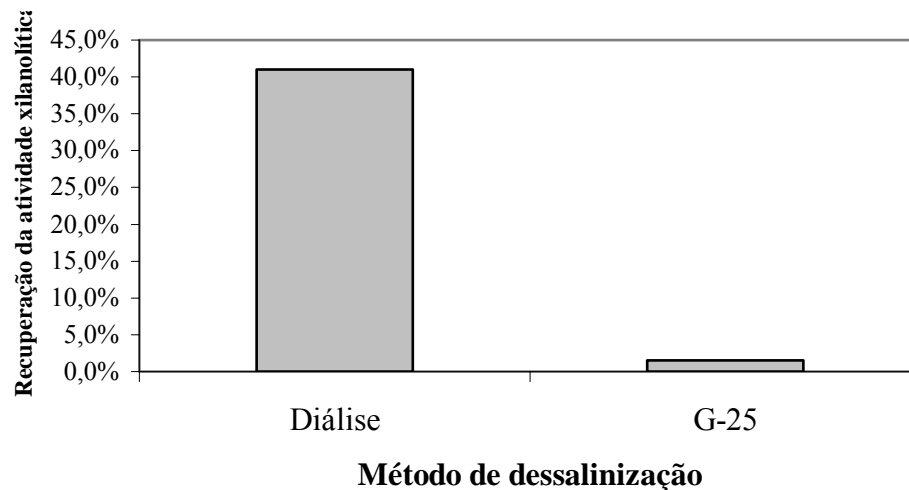


Figura 9 – Recuperação da xilanase da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* após dessalinização através de diálise ou através de coluna Sephadex G-25

Um outro problema do uso da coluna Sephadex G-25 foi a dificuldade de eluição da amostra através da coluna. Pois, além das proteínas muitos materiais foram precipitados com sulfato de amônio, o que dificultou a passagem da amostra pela coluna. Esse mesmo problema foi

observado por Monti, Terenzi e Jorge (1991), que observaram muitos materiais precipitáveis em etanol ou sulfato de amônio no filtrado de cultura, sendo esse material constituído principalmente por polissacarídeos. Segundo esses autores tais materiais dificultaram a purificação inicial das xilanases de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, porém o problema foi solucionado pelo tratamento com caolin que diminuiu a viscosidade do líquido.

No presente trabalho, após a diálise a amostra foi novamente centrifugada a 13000g por 10 min a 4°C para retirada desses materiais.

5.4.3 Cromatografia de troca iônica

Visando obter e posteriormente caracterizar os principais componentes do complexo enzimático excretado pela linhagem IFO-4626 e além disso conduzir ensaios para se determinar a eficiência de diferentes quantidades de enzima, em diferentes graus de pureza, no pré-branqueamento de polpa de pseudocaule de bananeira, a estratégia de purificação utilizada no presente trabalho constitui-se inicialmente de uma cromatografia de troca iônica.

Como sugerido por Haas et al. (1992), que purificou uma xilanase extracelular da linhagem Q 176 de *Penicillium chrysogenum*, a solução de proteínas obtida após a diálise do precipitado (0-90% de sulfato de amônio, *overnight*) ressuspendida, foi aplicada em uma coluna de troca iônica (no presente trabalho foi usada uma coluna com DEAE-Sephacel) equilibrada com Tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. As proteínas foram eluídas como sugerido por Haas et al. (1992) por um gradiente linear de 0 – 1M de NaCl. Em seu trabalho Haas et al. (1992) não mostra o perfil cromatográfico em DEAE-5-PW para as xilanases de *P. chrysogenum* e nem comenta em qual concentração de NaCl que as frações com atividade xilanolítica são eluídas.

No presente trabalho após a eluição através de um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, verifica-se dois picos de proteínas com atividade de xilanase (Figura 10), designados xilanases I e II. Estes dois picos de atividade indicaram que a linhagem IFO-4626 excretou nas condições de crescimento, um complexo enzimático constituído de duas xilanases distintas. A xilanase que não interagiu com a resina, xilanase I, correspondeu a 16,28% da xilanase do filtrado de cultura bruto; e a xilanase II, que ficou retida na coluna teve uma recuperação de 17,97% em relação ao filtrado de cultura bruto.

A xilanase II (Figura 10) foi eluída em uma faixa muito ampla de concentração de NaCl (225 a 725 mM, com pico em 300 mM). Assim na tentativa de obter uma porcentagem maior de purificação foram realizados outros experimentos na mesma coluna DEAE-Sephacel, porém realizando uma eluição do tipo *step-wise*.

A eluição do tipo *step-wise* é pouco usada na purificação de xilanases. Comumente como relatado nos trabalhos de Baraznekok et al. (1999); Carmona et al. (2005); Haas et al. (1992); Querido et al. (2006); Silva (2006) entre outros, a eluição na coluna de troca iônica é realizada através de um gradiente linear de sal. Porém, como relatado anteriormente, quando foi usado no presente trabalho um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M observou-se a eluição da xilanase II em um pico muito largo, optando-se dessa forma por mudar a estratégia de purificação.

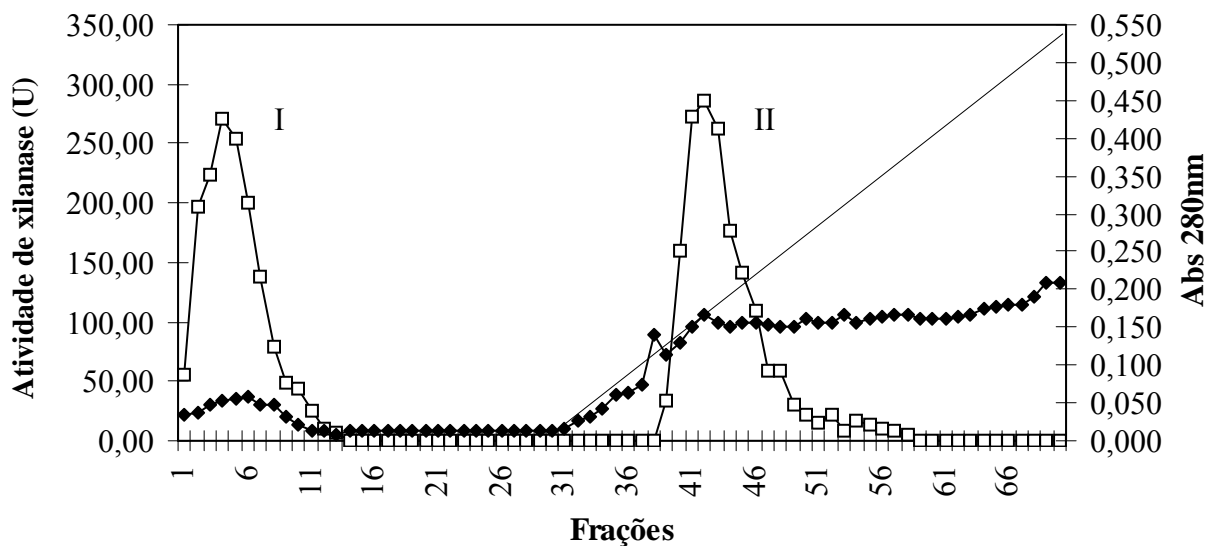


Figura 10 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. A amostra foi eluída em um gradiente linear de 0 a 1000 mM de NaCl. (□) Atividade de xilanase, (◆) Abs 280nm, (—) NaCl 0 a 1000 mM

Usando uma eluição do tipo *step-wise*, com diferentes concentrações de NaCl, foi observado da mesma forma que na eluição do tipo gradiente linear, dois picos de proteínas com atividade de xilanase (Figura 11). Porém, na Figura 11 observa-se que a maior fração de atividade de xilanase II foi obtida com uma eluição usando apenas 200 mM de NaCl, o que é favorável

para a purificação, já que grande parte das proteínas são eluídas após essa concentração de NaCl, como pode ser verificado através do acompanhamento do perfil da absorbância a 280nm.

Nesse perfil cromatográfico (Figura 11) fica evidenciado que uma das xilanases excretadas pela linhagem IFO-4626 (xilanase I) não se liga à resina, sendo eluída com tampão no primeiro volume da coluna. Haas et al. (1992) encontraram uma única xilanase para a linhagem Q 176 de *P. chrysogenum* crescida em xilana de *oat spelt* como fonte de carbono, sendo que esta xilanase ficou retida na coluna com DEAE-5-PW e só foi eluída após um gradiente de 0 a 1 M de NaCl.

Silva (2006) visando à purificação de xilanases de *Trichoderma inhamatum* e Carmona et al. (1998, 2005), visando à purificação de xilanases *Aspergillus versicolor*, usaram uma coluna de DEAE-Sephadex A-50 e observaram que uma das xilanases desses fungos não se ligava à resina.

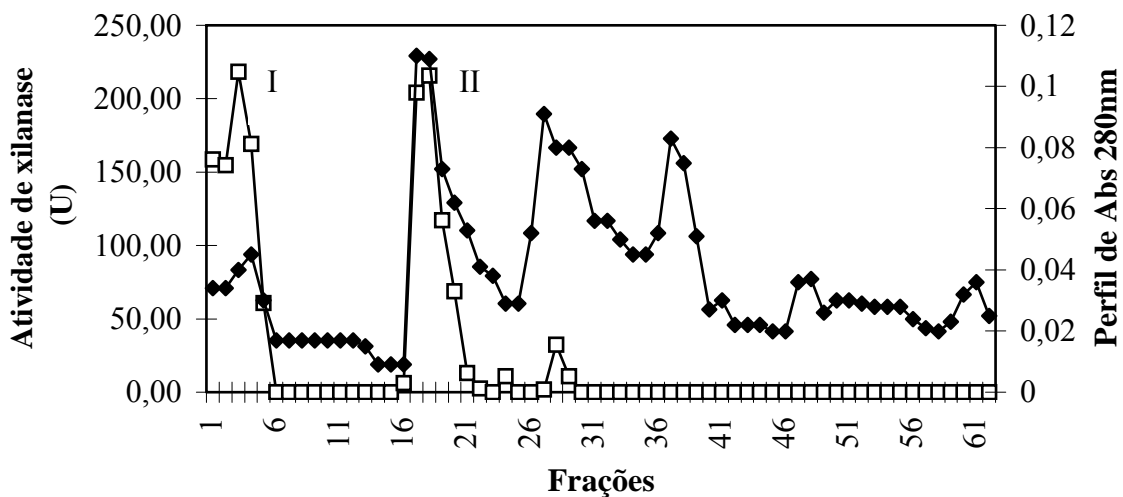


Figura 11 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. Eluição do tipo *step-wise* (0, 200, 400, 600, 800, 1000mM de NaCl). (□) Atividade de xilanase, (◆) Abs 280nm

Nota: Fração não-ligante - Frações 1 a 15; 200 mM de NaCl – Frações 16 a 25; 400 mM de NaCl – Frações 26 a 35; 600 mM de NaCl – Frações 36 a 45; 800 mM de NaCl – Frações 46 a 55; 1000 mM de NaCl – Frações 56 a 62

Na Figura 11 pode ser observado ainda um pequeno pico de atividade de xilanase quando eluição foi feita usando 400 mM de NaCl. Assim, uma nova eluição do tipo *step-wise* foi realizada com o intuito dessa fração se juntar com o pico denominado xilanase II. Para tanto, a

eluição foi realizada com 250 mM de NaCl e 1000 mM de NaCl. Uma fração não ligante (xilanase I) continuou a ser observada, porém apenas um pico de atividade de xilanase (xilanase II) foi observado usando eluição com NaCl (Figura 12). Pela absorbância a 280nm observa-se dois picos bem evidentes, um pico coincidente com xilanase II e outro pico eluído com 1000 mM de NaCl. Também, observa-se um aumento da absorbância a 280nm coincidente com o pico da xilanase I (Figura 12).

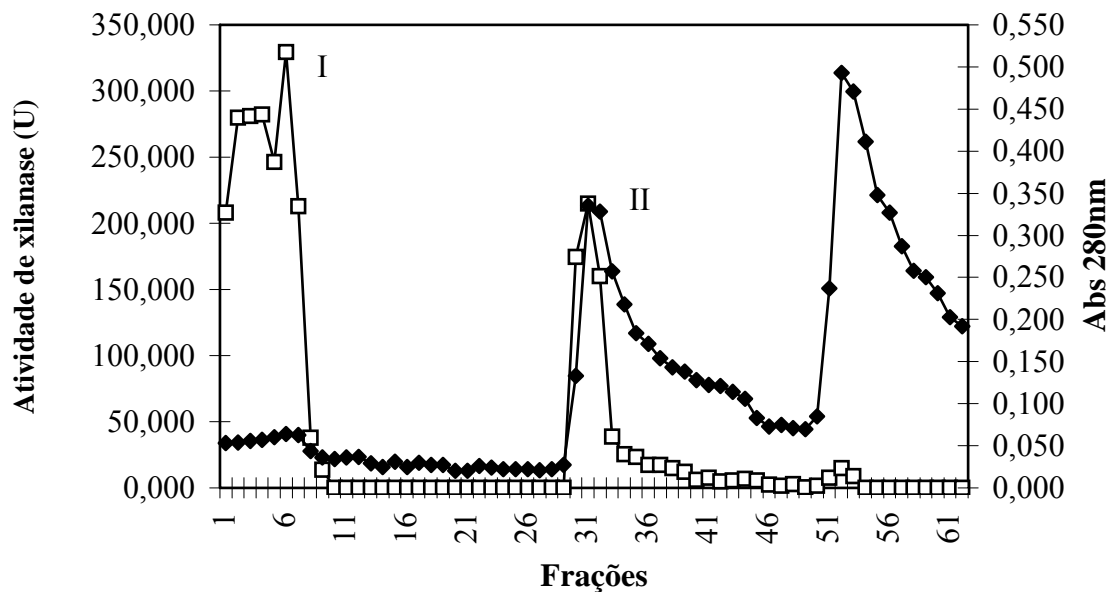


Figura 12 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. Eluição do tipo *step-wise* (250 e 1000mM de NaCl). (□) Atividade de xilanase, (◆) Abs 280nm

Nota: Fração não-ligante - Frações 1 a 29; 250 mM de NaCl – Frações 30 a 49; 1000 mM de NaCl – Frações 50 a 62

Com o objetivo de conseguir um maior fator de purificação para a xilanase II, uma eluição do tipo *step-wise* foi realizada com menor concentração de NaCl. Como pode se observar na Figura 13, a eluição em DEAE-Sephacel foi realizada também com 100 mM, além das concentrações já utilizadas anteriormente 250 mM e 1000 mM de NaCl (Figura 12), para tanto foram utilizados volumes de soluções de NaCl correspondentes a 2 vezes o volume da coluna.

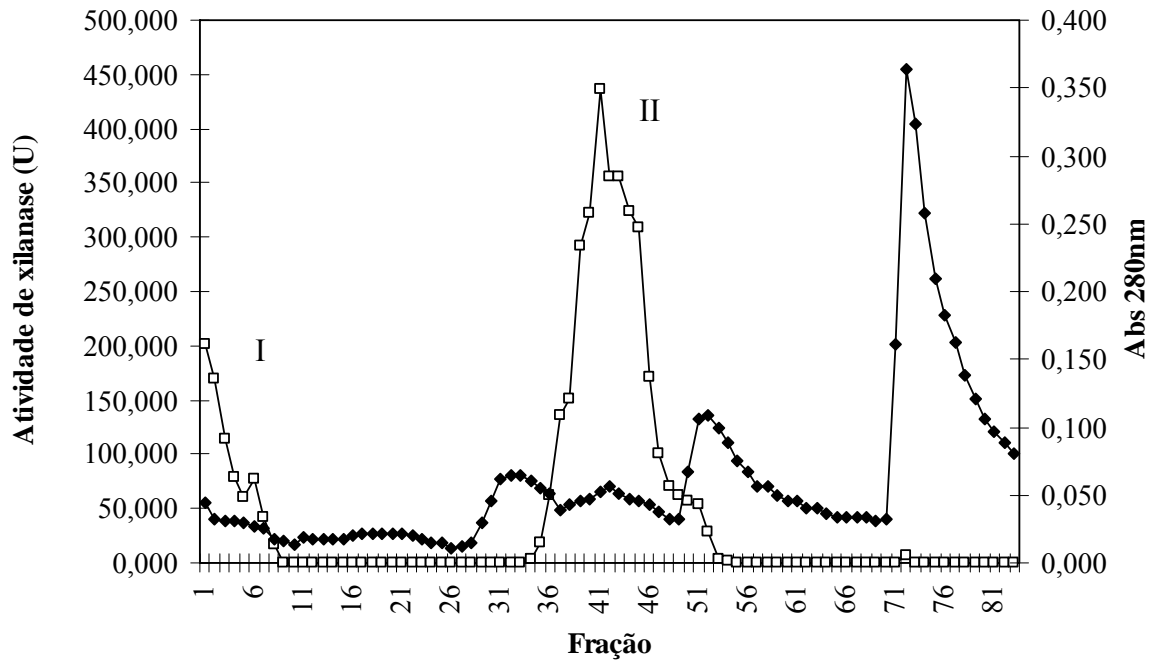


Figura 13 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. Eluição do tipo *step-wise* (100, 250 e 1000mM de NaCl). (□) Atividade de xilanase, (◆) Abs 280nm

Nota: Fração não-ligante - Frações 1 a 29; 100 mM de NaCl – Frações 30 a 50; 250 mM de NaCl – Frações 51 a 71; 1000 mM de NaCl – Frações 72 a 83

Na Figura 13, pode se observar que a xilanase II foi eluída com 100 mM de NaCl, o que permitiu um fator de purificação de 2,93 para essa xilanase (Tabela 11). Como se observa nessa mesma Figura, a xilanase II foi eluída anteriormente a um pico de proteínas que foram eluídas somente com 250 mM de NaCl, o que pode ser verificado pelo espectro de absorção a 280nm. Porém, algumas frações eluídas com 250 mM apresentaram atividade de xilanase, assim optou-se por aumentar o volume de eluição com 100 mM de NaCl para 3 vezes o volume da coluna.

Tabela 11 – Purificação das Xilanase I e II da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* em DEAE-Sephacel (Eluição com 0, 100, 250 e 1000 mM de NaCl)

	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto	11966,66	7,77	1539,19	100,00	1,00
Filtrado bruto centrifugado	14792,59	7,04	2102,66	123,62	1,37
Amostra dialisada	4160,00	1,42	2936,41	34,76	1,91
DEAE-Sephacel					
Xilanase I	758,46	0,42	1826,51	6,34	1,19
Xilanase II	2960,53	0,66	4511,75	24,74	2,93

Nota: Xilanase I = frações 1 a 8 e Xilanase II = frações 37 a 49 (Figura 13)

A eluição com 3 vezes o volume da coluna de uma solução de 100mM de NaCl (Figura 14) possibilitou um alto grau de purificação da xilanase II (Tabela 12).

Tanto na Figura 13 quanto na Figura 14, observa-se que nas frações iniciais eluídas com 100 mM de NaCl não há atividade de xilanase, porém existe um pico de outras proteínas. Esse fato, evidencia a importância da manutenção das condições padrões do experimento, como pH do tampão utilizado e volume e concentração de NaCl, para que esse seja reproduzido e um fator de purificação similar seja obtido. De acordo com Voet, Voet e Pratt (2002), a afinidade de ligação de uma proteína depende da presença de outros íons que competem com ela pela ligação ao trocador de íons e do pH da solução, que influencia na carga líquida da proteína.

As diferenças de recuperação da xilanase I (Tabelas 11 e 12), que foi eluída na fração não-ligante, deve-se provavelmente à perda dessa xilanase (Tabela 11) enquanto a amostra estava sendo colocada na coluna. Nesse experimento (Figura 13 e Tabela 11), ocorreu um problema durante a colocação da amostra, sendo que algumas frações não foram coletadas em tubos e assim não foram quantificados. Ressalta-se que esse experimento foi feito sem repetição, uma vez que optou-se por mudar a estratégia de purificação e usar um volume maior da solução de 100 mM de NaCl (Figura 14 e Tabela 12). Nesse novo experimento, a recuperação da xilanase I foi maior e parecida com a recuperação da xilanase II, resultados que concordam com os obtidos na

eluição do tipo gradiente linear apresentados na Figura 10. A purificação das xilanases em DEAE-Sephacel usando uma eluição com 3 vezes o volume da coluna de uma solução de 100 mM de NaCl foi repetida por três vezes, sendo que os resultados encontrados foram similares tanto em relação à recuperação das xilanases, quanto ao fator de purificação.

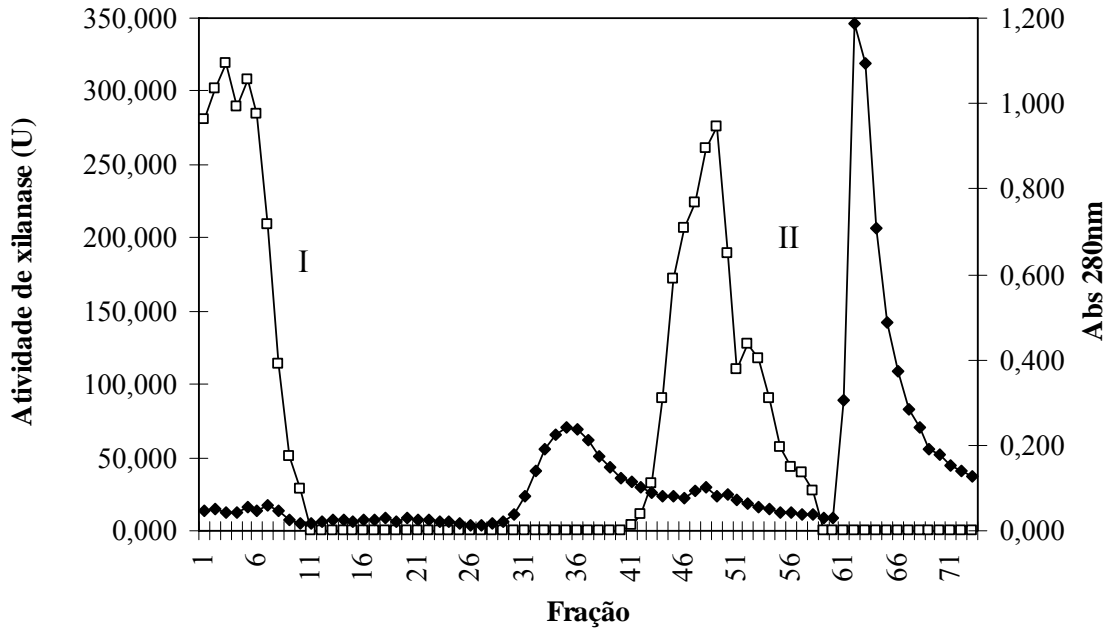


Figura 14 – Perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*. Eluição do tipo *step-wise* (100 e 1000 mM de NaCl).

(□) Atividade de xilanase, (◆) Abs 280nm

Nota: Fração não-ligante - Frações 1 a 29; 100 mM de NaCl – Frações 30 a 58; 1000 mM de NaCl – Frações 59 a 73

Tabela 12 – Purificação das Xilanase I e II da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* em DEAE-Sephacel (Eluição com 0, 100 e 1000 mM de NaCl)

	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto	14836,59	10,25	1447,98	100	1,00
Filtrado bruto centrifugado	13426,47	8,01	1675,58	90,50	
Amostra dialisada DEAE-Sephacel	7022,87	2,41	2917,60	47,33	2,01
Xilanase I	2106,01	0,97	2176,11	14,19	1,50
Xilanase II	1874,75	0,02	109710,88	12,64	75,77

Nota: Xilanase I = frações 1 a 8 e Xilanase II = frações 44 a 55 (Figura 14)

Apesar do uso no presente trabalho de somente uma coluna para purificar as xilanases da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*, o uso de mais de uma coluna, com diferentes princípios de interação entre a xilanase e a fase estacionária, é adotado por diversos pesquisadores visando uma purificação mais eficaz. Baraznekok et al. (1999), purificaram três xilanases a partir de um filtrado de cultura de *Chaetomium cellulolyticum*, para tanto esses pesquisadores primeiramente usaram duas colunas de troca aniônica. A amostra que não se ligou a DEAE-Toyopearl foi aplicada em uma coluna Macro prep Q, após a eluição com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl duas frações com atividade de xilanase foram obtidas. Essas duas frações foram aplicadas separadamente em uma coluna hidrofóbica - Phenyl Superose, sendo a fração I eluída com um gradiente de 1,2 a 0,6 M de sulfato de amônio, sendo obtida duas frações com atividade de xilanase e a fração II eluída com um gradiente de 1,2 a 0,0 M de sulfato de amônio. Apesar da homogeneidade eletroforética em SDS-PAGE, Baraznekok et al. (1999) obtiveram uma baixa recuperação para as três xilanases purificadas. Carmona et al. (2005) visando à purificação da xilanase II produzida por *Aspergillus versicolor*, adotaram como primeiro passo para a purificação uma coluna com DEAE-Sephadex A-50, a amostra com atividade de xilanase, eluída com um gradiente de NaCl, foi concentrada através de osmose reversa e aplicada em um sistema cromatográfico de filtração em gel em HPLC, usando para tanto uma coluna Shodex Asahipak

GF-510 HQ. Com esses procedimentos, Carmona et al. (2005) conseguiram purificar 28 vezes essa xilanase II, porém com uma recuperação de apenas 3,1%. No trabalho de Monti, Terenzi e Jorge (1991), a amostra (filtrado de cultura de *Humicola grisea*) primeiramente foi aplicada em uma coluna com DEAE-celulose, sendo obtidos dois picos com atividade de xilanase. A Forma 2, após ser concentrada e dialisada, foi aplicada em uma coluna com Sephadex G-200, sendo alcançada após eluição nessa coluna de filtração em gel uma purificação de 18,7 vezes e uma recuperação de 2,3%. Por outro lado, Haas et al. (1992) conseguiram uma alta recuperação da atividade de xilanase (68%), após purificação de uma xilanase de *Penicillium chrysogenum* (4,1 vezes) em uma coluna com DEAE-5-PW seguida por eluição em um sistema cromatográfico de filtração em gel (BIO Sil TSK 250).

Assim, apesar de diversos autores terem conseguido purificar as xilanases de diferentes microrganismos somente após o uso de distintos sistemas cromatográficos, no presente trabalho tentou-se otimizar a purificação somente em uma coluna, buscando além de uma maior recuperação, um menor tempo e um custo mais baixo de purificação, uma vez que as xilanases purificadas foram utilizadas em experimentos posteriores de branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de *Musa* sp..

Portanto, apesar de não se conseguir um bom fator de purificação para a xilanase I, a xilanase II apresentou um alto grau de purificação após eluição em DEAE-Sephacel com 3 vezes o volume da coluna de uma solução de 100 mM de NaCl (Tabela 12). As frações que apresentaram alta atividade de xilanase (U) foram reunidas e analisadas quanto à pureza em géis de poliacrilamida.

Devido à baixa concentração de proteína nas amostras, optou-se pela coloração com prata. Esse tipo de coloração possui alta sensibilidade, assim a heterogeneidade eletroforética em SDS-PAGE apresentada na Figura 15 provém da alta sensibilidade do método, uma vez que foi obtido um alto fator de purificação para a xilanase II (Tabela 12) e mesmo assim, algumas bandas mais claras, possivelmente de outras proteínas, aparecem no gel.

A xilanase I teve uma purificação menos eficiente, uma vez que não se ligou à resina e assim foi eluída juntamente com outras proteínas. Fato esse evidenciado na Figura 15. Porém, de acordo com Gerard (1990) a heterogeneidade cromatográfica ou eletroforética de uma proteína homogênea pode ser o resultado da heterogeneidade em seus carboidratos constituintes. As duas xilanases foram identificadas como glicoproteínas, apresentando um alto conteúdo de

carboidratos, 79,37% para a xilanase I e 2963,32% para a xilanase II. Algumas glicoproteínas eucarióticas, em sua maioria pouco comuns, contêm bastante carboidrato, até mesmo mais massa desse do que de polipeptídeos. Como consequência da densa glicosilação com estruturas heterogêneas, essas moléculas apresentam uma alta massa molecular (GERARD, 1990). As duas xilanases identificadas no presente trabalho apresentam pequena massa molecular, assim o incomum teor de açúcares neutros encontrados para a xilanase II, pode ter ocorrido devido a uma limitação do método adotado, ocasionado pela baixa quantidade de proteína usada durante a análise. Outro fato que pode explicar o alto conteúdo de carboidratos encontrados para a xilanase II é a possibilidade da ligação covalente entre a enzima e um polissacarídeo de parede celular excretado pelo microrganismo. Tal acontecimento é relatado no trabalho de Zanoelo (2001), que confirmou, através da hidrólise ácida da enzima e posterior análise em cromatografia de camada delgada, a presença de um polissacarídeo (possivelmente um N-acetilgalactosaminaglicana, provido de cargas) ligado à xilanase extracelular de *Scytalidium thermophilum*.

Devido à heterogeneidade em SDS-PAGE não se determinou a massa molecular das xilanases por esse método. Contudo, a purificação foi conduzida para eliminar outras proteínas e concentrar a xilanase, assim avalia-se que pela maior concentração de proteínas em algumas bandas essas seriam as xilanases. Por essa inferência, a massa da xilanase II em SDS-PAGE seria a mesma encontrada em cromatografia de filtração em gel, ou seja, 20 kDa (Figuras 15 e 16), porém para a xilanase I haveria grande diferença, 12,6 kDa em cromatografia de filtração em gel (Figura 16) e 30 kDa em SDS-PAGE (Figura 15). Essa diferença pode ter sido constatada porque a banda, com massa aproximada em 30 kDa, não é a xilanase I ou pela interferência na migração da xilanase I em SDS-PAGE devido ao alto conteúdo de carboidrato. As discrepâncias de massa molecular em SDS-PAGE e cromatografia de filtração em gel são relatadas por outros pesquisadores. Zanoelo (2001) encontrou para a xilanase de *Scytalidium thermophilum*, com 90% de carboidrato, uma massa de 16 kDa por cromatografia de filtração e 29 kDa em SDS-PAGE. As xilanases I, com 79% de carboidrato e a xilanase II com 62% de carboidrato purificadas de *Trichoderma inhamatum* por Silva (2006) tiveram suas massas moleculares em SDS-PAGE estimadas em $19 \pm 1,1$ kDa e $21 \pm 0,8$ kDa e em cromatografia de filtração estimadas em 14 kDa e 14,6 kDa, respectivamente para a xilanase I e II. Sandrim et al. (2005) estimaram as massas moleculares das xilanases de *Aspergillus caespitosus* por SDS-PAGE em 27 kDa e 17,7 kDa para as xilanases I (41% de carboidrato) e II (28% de carboidrato) respectivamente, já em

cromatografia de filtração em gel obtiveram uma massa de 26,3 kDa para a xilanase I e de 7,7 kDa para a xilanase II.

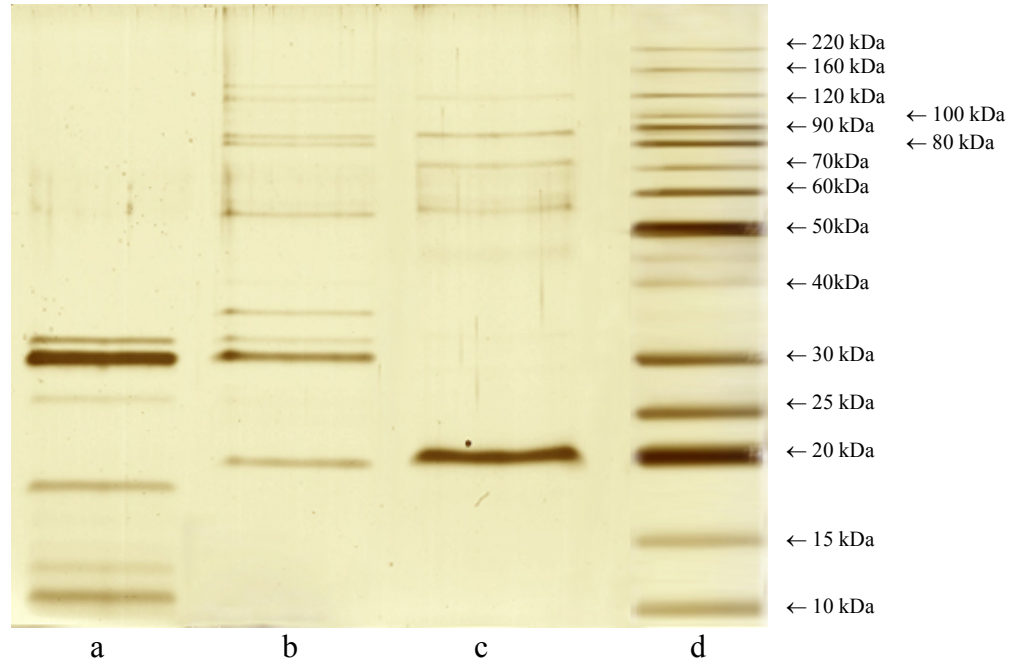


Figura 15 – Perfil SDS-PAGE em gel com 10% de acrilamida. (a) Xilanase I, (b) Filtrado de cultura, (c) Xilanase II – eluída em DEAE-Sephacel com 100 mM de NaCl, (d) Padrões de massa molecular

As diferenças de massa molecular encontradas para a mesma xilanase por SDS-PAGE e por cromatografia de filtração em gel podem ocorrer por dois motivos principais. Silva Junior (2001); Zanoelo (2001) e outros pesquisadores sugerem que a glicosilação interfere na migração da proteína no gel, devido à tendência dessas se comportarem de uma forma anômala em SDS-PAGE. A ligação do SDS com as partes hidrofóbicas das proteínas leva a um aumento das cargas negativas das mesmas, tornando-as praticamente indistinguíveis do ponto de vista de carga. Assim, se a interação da proteína com o SDS sofrer interferência devido, por exemplo, à presença de carboidratos, haverá uma diminuição da mobilidade do polipeptídeo, o que levaria a hiperestimar a massa molecular das glicoproteínas. Por outro lado, Sandrim et al. (2005) assumem que pode ocorrer uma interação carboidrato-carboidrato da proteína com a matriz do gel presente na coluna, isso levaria a um aumento da retenção e conseqüentemente subestimaria a massa molecular.

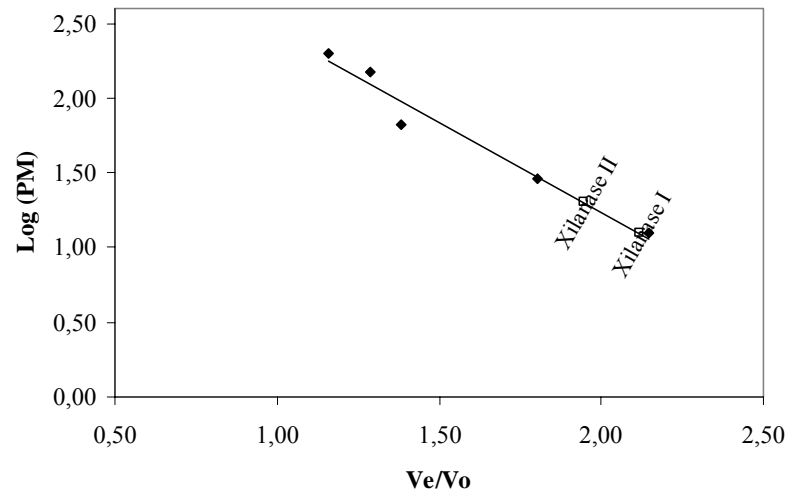


Figura 16 – Massa molecular das xilanasas I e II em cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S200 (26/60)). Fluxo de 1,3 mL/min

O comportamento da xilanasase I em PAGE (Figura 17) é mais um indício de que a glicosilação dessa isoforma pode ter interferido na sua migração em gel. Na eletroforese nativa, onde a separação ocorre sob influência das cargas, a xilanasase I não conseguiu penetrar no gel durante o tempo de corrida, demonstrando a diminuição da mobilidade devido à influência do carboidrato. Esse fato pode confirmar a hiperestimativa da massa molecular da xilanasase I em SDS-PAGE.

Carmona et al. (1998) apresentam resultados concordantes com os do presente trabalho. A xilanasase purificada de *Aspergillus versicolor*, com 71% de carboidrato, também apresentou uma migração lenta em gel não-desnaturante. Porém, a xilanasase II (41% de carboidrato) purificada por Sandrim et al. (2005) a partir de filtrado de cultura de *Aspergillus caespitosus* e que apresentou massa molecular distinta em SDS-PAGE e em cromatografia de filtração, não apresentou problema na migração em sistema não-desnaturante.

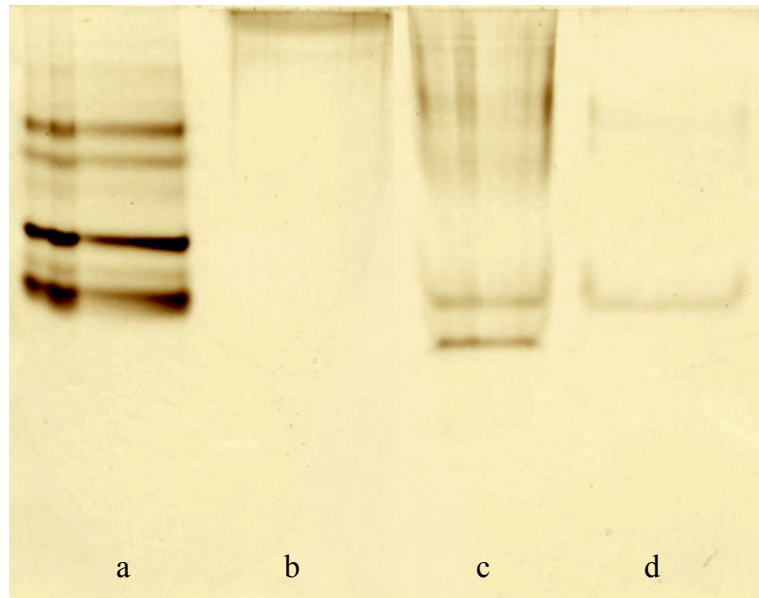


Figura 17 – Perfil PAGE em gel com 10% de acrilamida. (a) Padrões de massas moleculares: soroalbumina bovina (monômero (66 kDa) e dímero (132 kDa)), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa), (b) Xilanase I, (c) Filtrado de cultura, (d) Xilanase II – eluída em DEAE-Sephacel com 100mM de NaCl

A alta massa molecular da xilanase I em PAGE poderia ser atribuída à presença de um complexo xilanolítico (xilanossoma¹) como verificado por Jiang et al. (2004) para *Streptomyces olivaceoviridis*. As várias bandas em SDS-PAGE seriam mais um indicativo da possibilidade da ocorrência de um complexo xilanolítico. Porém, a baixa massa molecular em cromatografia de filtração em gel exclui essa possibilidade.

A xilanase II migrou normalmente em PAGE (Figura 17), apresentando mais de uma banda, possivelmente devido à alta sensibilidade da coloração com prata. Porém, apresentou uma banda mais evidente na faixa de 20 kDa. Assume-se no presente trabalho, que essa seja a banda correspondente à xilanase II.

A maioria das xilanases são descritas como possuindo massas moleculares entre 8 e 145 kDa (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). Entre aquelas de origem fúngica, as massas moleculares

¹ Xilanossoma são complexos multienzimáticos, multifuncionais e distintos encontrados na superfície de vários microrganismos (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

situam-se entre 10 e 83 kDa (CARMONA, 1995; ZANOELO, 2001). Portanto, as massas moleculares das xilanases I e II da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* encontradas no presente trabalho apresentam-se de acordo com aquelas apresentadas na literatura.

5.5 pH ótimo de reação

Segundo Sunna e Antranikian (1997), o pH ótimo de reação para D-Xilanases de grande número de microrganismos encontra-se entre 4 e 7, valores que podem ser observados na Tabela 2 e nos resultados do presente trabalho. O pH ótimo de reação para o complexo xilanolítico e para a xilanase I da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* foi determinado em 5,0 (Prob. > F = 0,00001) e para a xilanase II o pH ótimo de reação encontra-se entre 4,5 e 5,5 (Prob. > F = 0,00001), com uma menor atividade em pH 5,0 (Figura 18). Diferentemente da xilanase II, a xilanase I apresentou uma queda de atividade em pH 5,5 e apresentou atividade em uma faixa mais ampla de pH.

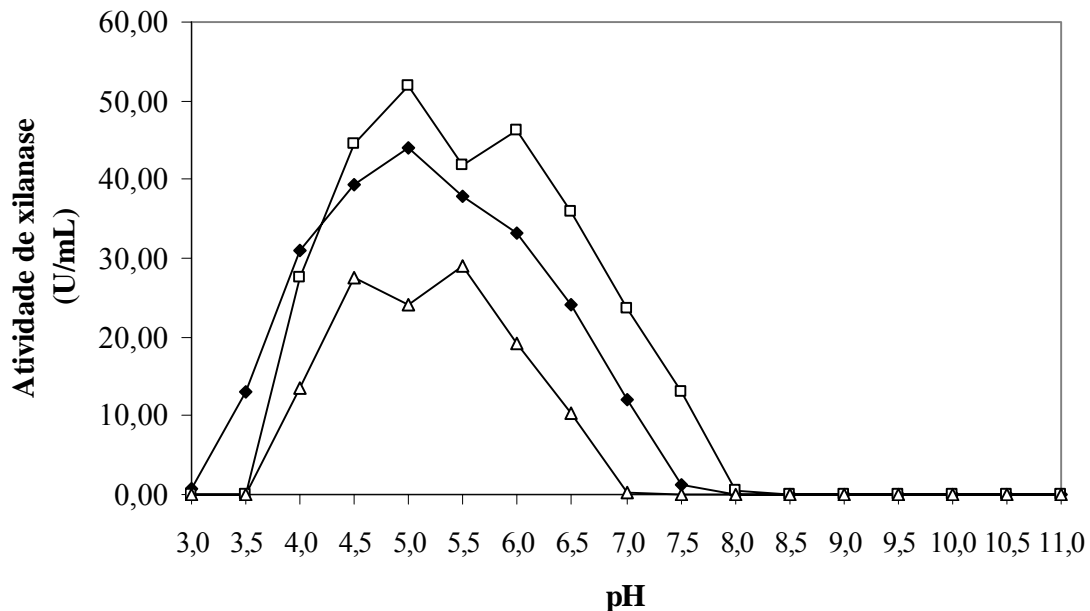


Figura 18 – Efeito do pH sobre a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura (◆) e nas xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 8,094%); Xilanase I (C.V. = 9,085%); Xilanase II (14,124%)

5.6 Temperatura ótima de reação

Constatou-se que a temperatura ótima para a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 é 45°C (Prob. > F = 0,00001). Para a xilanase I a temperatura ótima de reação foi determinada como sendo 50°C (Prob. > F = 0,00001), sendo assim superior àquela encontrada para o filtrado de cultura. Já para a xilanase II a melhor temperatura para atividade está na faixa de 40 a 50°C (Prob. > F = 0,00001) (Figura 19). De acordo com Kulkarni, Shendye e Rao (1999) a temperatura ótima para endoxilanases de origem fúngica e bacteriana varia entre 40 e 60°C. Na Tabela 2 observa-se a temperatura ótima para a atividade de xilanases de diferentes microrganismos, sendo que a maioria dos valores observados concorda com os apresentados para as xilanases I e II purificadas no presente trabalho.

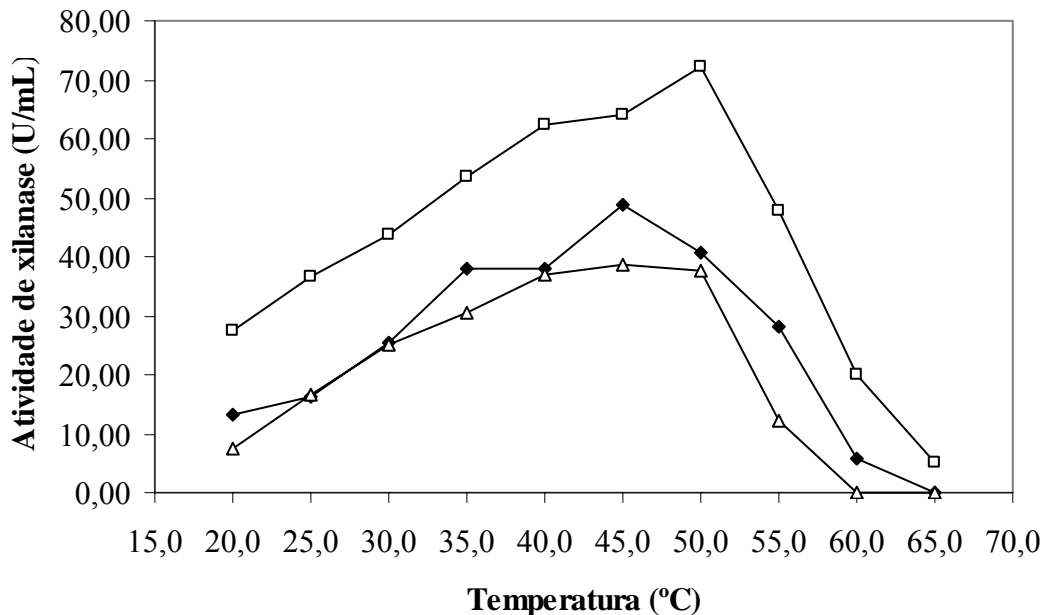


Figura 19 – Efeito da temperatura sobre a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura (◆) e nas xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 8,358%); Xilanase I (C.V. = 6,736%); Xilanase II (7,950%)

5.7 Estabilidade em diferentes pHs

Quando juntas no filtrado de cultura, as xilanases apresentaram boa estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 5,5 (Figura 20), verificando-se uma queda após o pH 6,0 sendo significativo o ajuste linear da equação de regressão (Prob. > F = 0,00009). Porém, os diferentes tampões usados para determinação da estabilidade das xilanases podem ter influenciado os resultados, já que se verifica após pH 8,0 um aumento da atividade residual; aumento esse que coincide com a faixa de troca do tampão McIlvaine pelo tampão Glicina-NaOH. Essa maior atividade residual na faixa de pH de 8,5 a 10,0 é verificada pelo ajuste significativo das equações de regressão em um grau 6 e 7 (Prob. > F = 0,01818 e Prob. > F = 0,03565).

Após a purificação, as xilanases I e II apresentaram comportamento distinto em relação à estabilidade a pH. A xilanase II apresentou um comportamento similar ao apresentado pelas xilanases presentes no filtrado de cultura, ou seja, apresentou estabilidade em toda a faixa de pH estudada (Prob. > F = 0,34631) (Figura 20). Para a xilanase I foi encontrada uma atividade residual acima de 60% entre pH 3,5 e 7,5, sendo verificada uma queda em pH 5,0, que é o pH ótimo para atividade dessa enzima. Acredita-se que a alta atividade residual da xilanase I nos pH 8,5 e 9,0 deva-se à mudança nos tampões. Verifica-se, portanto, que a xilanase I não foi estável após 24h em pH 3,0 e valores de pH acima de 9,5 (Prob. > F = 0,00001) (Figura 20). D-Xilanases de diferentes organismos normalmente apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH (3-10) (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999). Kansoh e Nagieb (2004) purificaram parcialmente uma xilanase de *Streptomyces galbus* e observaram atividade relativa maior que 50% entre pH 5,0 e 8,0 após incubação a 4°C por 1h. Carmona et al. (1998) observaram boa estabilidade da xilanase I de *Aspergillus versicolor* em até 60 min na faixa de pH 4,0-8,0.

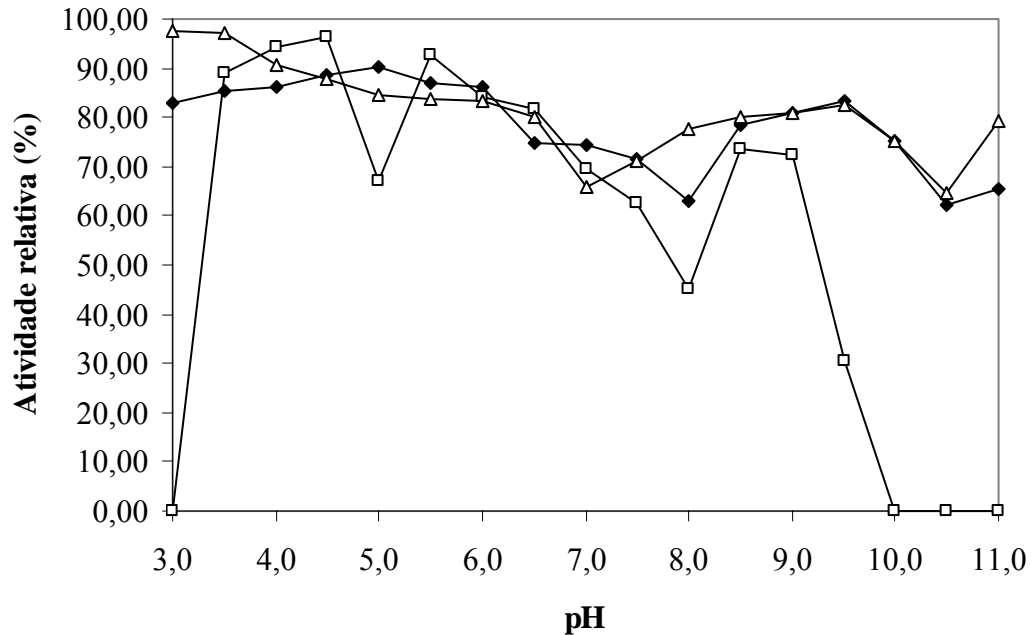


Figura 20 – Estabilidade em diferentes valores de pH das xilanases presentes no filtrado de cultura (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 11,244%); Xilanase I (C.V. = 14,038%); Xilanase II (18,121%)

5.8 Estabilidade térmica

Na Figura 21 observa-se que a xilanase II apresenta boa estabilidade à temperatura de 40°C, não havendo diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos analisados (Prob. > F = 0,12487). A alta variação de atividade da xilanase II, observada nos primeiros 90 min, foi encontrada nas três repetições do experimento. Assim, acredita-se que exista algum composto que interfira na atividade dessa xilanase e que esse composto é inativado após 90min a temperatura de 40°C.

Tanto as xilanases presentes no filtrado de cultura como a xilanase I apresentaram um ajuste quadrático das equações de regressão para a atividade relativa a 40°C, respectivamente Prob. > F = 0,00131 e Prob. > F = 0,00026, indicando uma queda de atividade com o decorrer do tempo (Figura 21).

A meia vida a 40°C da xilanase II e das xilanases presentes no filtrado de cultura não foram determinadas no presente trabalho, uma vez que apresentaram atividade relativa maior que 50% mesmo após 270 min. Já para a xilanase I, a meia vida aproximada a 40°C é de aproximadamente 133 min, mantendo-se com atividade residual de 50% até 198 min. Como apresentado no presente trabalho, a xilanase de *Penicillium expansum* purificada por Querido et al. (2006) também mostrou-se estável a 40°C, porém entre 50 e 70°C a atividade caiu para menos que 48%.

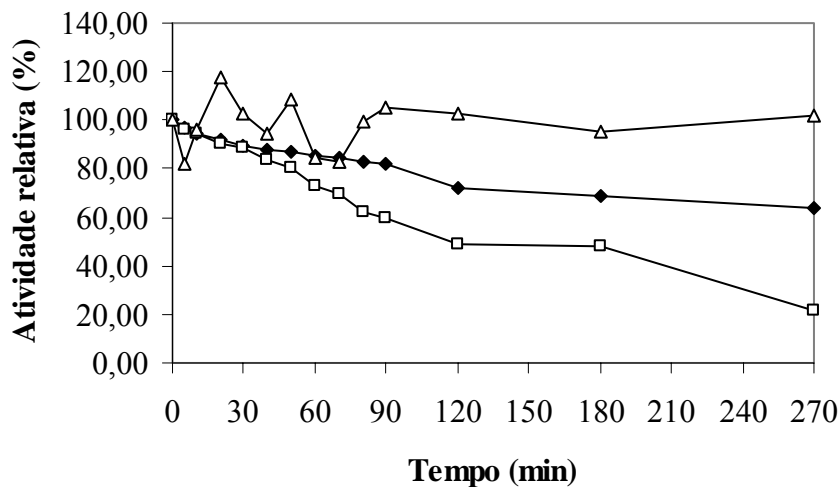


Figura 21 – Estabilidade térmica a 40°C das xilanases presentes no filtrado de cultura (♦) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 5,276%); Xilanase I (C.V. = 8,378%); Xilanase II (13,715%)

Devido à baixa estabilidade térmica a 40°C da xilanase I, optou-se por realizar o experimento de estabilidade a 50°C para todas as xilanases somente até 60 min. Na Figura 22 pode-se observar que a 50°C, quando juntas no filtrado de cultura, as xilanases apresentaram uma acentuada perda de atividade com o decorrer do tempo, sendo a equação de regressão ajustada por uma equação de quinto grau (Prob. > F = 0,00029) e sua meia vida estimada em 17,6 min. Carmona et al. (2005) encontraram um perfil bifásico para a termoinativação da xilanase II de *Aspergillus versicolor* que apresenta menos de 40% da atividade residual após 40 min a 50°C, sendo a perda de atividade menos acentuada após esse período. Esses pesquisadores sugerem que

esse perfil bifásico deva-se à existência de diferentes isoenzimas com diferentes taxas de desnaturação ou reflete a habilidade da enzima existir em mais que um estado de conformação estável.

Como as duas xilanases quando purificadas apresentaram boa estabilidade térmica a 50°C, apresentando uma pequena perda de atividade no decorrer do tempo, acredita-se que exista algum composto no filtrado de cultura que ativado pela temperatura interfira na atividade. Para a xilanase I, o ajuste linear da regressão foi significativo (Prob. > F = 0,00087) e para a xilanase II o ajuste quadrático foi significativo (Prob. > F = 0,01208). Uma boa termoestabilidade a 50°C também é relatada em outros trabalhos. Silveira et al. (1999) comenta que a xilanase 2 purificada a partir do filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* tem sua atividade reduzida para 80% somente após 4h nessa temperatura. Ximenes et al. (1999) observaram uma meia vida a 50°C de 150 min para a xilanase I de *Acrophialophora nainiana*.

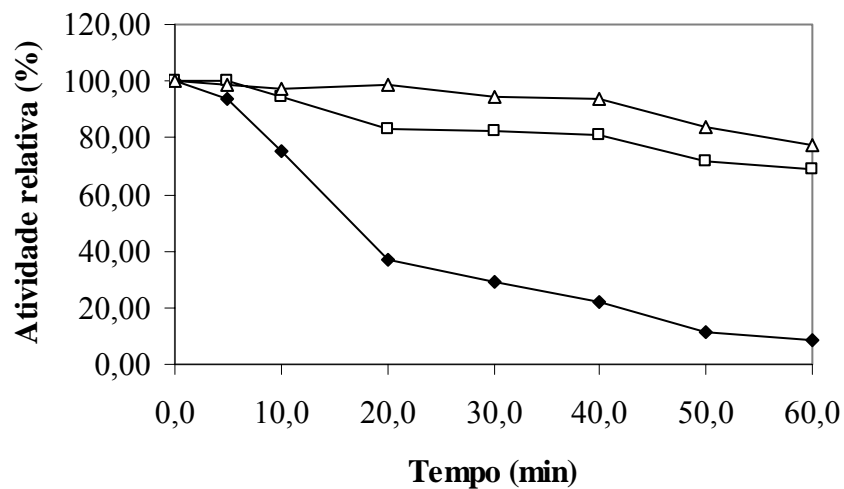


Figura 22 – Estabilidade térmica a 50°C das xilanases presentes no filtrado de cultura (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 8,588); Xilanase I (C.V. = 14,884%); Xilanase II (C.V. = 5,283%)

Na temperatura de 60°C, as xilanases I e II e o complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura não foram estáveis (Figura 23). Após 2 min a 60°C, a xilanase II perdeu toda a atividade e as xilanases presentes no filtrado de cultura apresentaram atividade de somente 27%

da inicial. Observa-se um ajuste cúbico das equações de regressão para as xilanases presentes no filtrado de cultura (Prob. > F = 0,00078) e para a xilanase II (Prob. > F = 0,00001). A inativação térmica a 60°C para a xilanase I ocorreu após 3 min nessa temperatura, sendo essa regressão ajustada quadraticamente (Prob. > F = 0,00019) (Figura 23). A maioria das xilanases fúngicas apresenta baixa estabilidade a 60°C. Carmona et al. (2005) encontrou uma meia vida de 1,7 min a 60°C para a xilanase II de *Aspergillus versicolor*. A xilanase I do mesmo fungo apresentou uma meia vida de 15 min a 60°C (CARMONA et al, 1998), Carmona et al. (2005) sugerem que isso se deve à maior quantidade de açúcar presente na xilanase I. Esses resultados não concordam com os do presente trabalho, onde a xilanase I apresentou um alto grau de glicosilação, mas apresentou baixa estabilidade térmica a 60°C. A baixa estabilidade encontrada no presente trabalho difere dos resultados apresentados por Szendefy, Szakacs e Christopher (2006), que observaram uma atividade residual de 40% e 10% da original após incubação por 10 e 30 min respectivamente da xilanase de *Aspergillus oryzae* NRRL 1808.

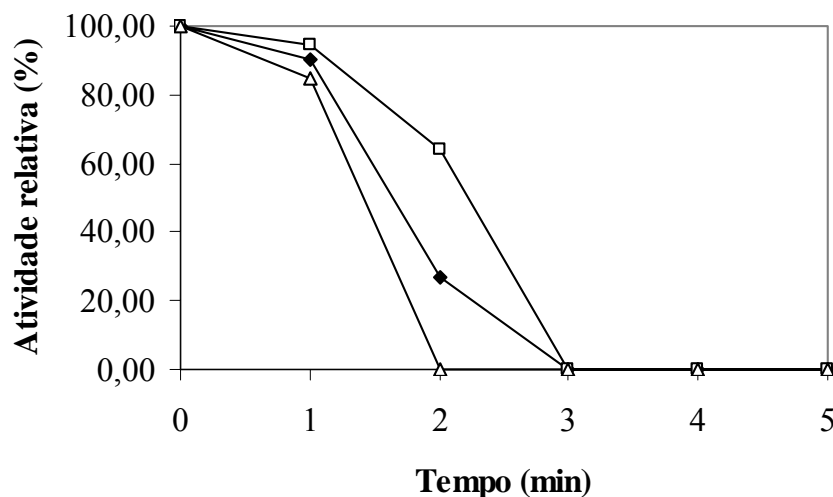


Figura 23 – Estabilidade térmica a 60°C das xilanases presentes no filtrado de cultura (♦) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 11,489%); Xilanase I (C.V. = 10,377%); Xilanase II (1,936%)

A polpação kraft é conduzida sob alta temperatura e alcalinidade, assim o ideal é que as enzimas utilizadas após a obtenção da polpa sejam tolerantes a essas condições. A baixa

estabilidade térmica das xilanases I e II é um ponto negativo para seu uso na indústria de papel e celulose. Porém, segundo Sriprang et al. (2006) vários estudos comparando proteínas mesofílicas e termofílicas têm revelado que em geral proteínas termofílicas possuem conteúdo mais alto de arginina em sua superfície, o que pode estar associado à sua maior estabilidade a alta temperatura. No trabalho de Sriprang et al. (2006), a introdução de resíduos de arginina na superfície Serina/ Treonina da xilanase de *Aspergillus niger* causou um incremento na termoestabilidade da enzima na presença de substrato.

Outra alternativa para aumentar a termoestabilidade das xilanases é a imobilização da enzima. A imobilização de enzimas ou microrganismos em materiais sólidos oferece várias vantagens, como o uso da enzima por mais de uma vez, facilidade na separação do produto e aumento da estabilidade enzimática (BEG et al., 2001). Gawande e Kamat (1998) observaram para as xilanases imobilizadas das linhagens 5 e 44 de *Aspergillus* sp. um aumento da meia vida a 60°C de 15 para 30 min e de 10 para 25 min, respectivamente.

Dessa forma, sugere-se que estudos de imobilização enzimática e de mutação sítio dirigida das xilanases da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* sejam conduzidos, uma vez que podem contribuir para melhorar a termoestabilidade dessa enzima, permitindo seu uso de uma forma mais otimizada na indústria de papel e celulose.

5.9 Efeito de íons metálicos e reagentes na atividade de xilanase

A inibição ou ativação da atividade de xilanase frente alguns íons metálicos e outros reagentes mostram algumas diferenças entre as xilanases I e II purificadas no presente trabalho. Esse tipo de diferença também foi observado por Sandrim et al. (2005) para xilanases de *Aspergillus caespitosus*.

Como pode se observar na Tabela 13, as xilanases presentes no filtrado de cultura foram ativadas pela presença de Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} e DTT e inibidas pela presença de Zn^{+2} , SDS, Pb^{+2} e Hg^{+2} . A xilanase I teve um comportamento, perante essas substâncias, parecido com o das xilanases presentes no filtrado de cultura; a atividade da xilanase I foi ativada por DTT, Ca^{+2} e Mn^{+2} e inibidas por Cu^{+2} , Zn^{+2} , SDS e Hg^{+2} . Já a xilanase II foi menos sensível, sendo inibida em 84% somente por Hg^{+2} . A ativação da xilanase II foi observada por diversos íons: Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , além de NH_4^+ e DTT.

Tabela 13 – Efeito de íons metálicos e outras substâncias na atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura e das xilanases I e II da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

(1) Filtrado de Cultura			(2) Xilanase I			(3) Xilanase II		
Substância	Média	5%	Substância	Média	5%	Substância	Média	5%
DTT	184,88	a	DTT	174,90	a	DTT	199,72	a
Ca ⁺²	154,96	b	Ca ⁺²	129,35	b	Mn ⁺²	179,40	a
Mn ⁺²	146,38	b	Mn ⁺²	126,63	bc	Co ⁺²	142,28	b
Fe ⁺²	117,86	c	Ba ⁺²	116,43	bcd	Fe ⁺²	137,49	bc
Ba ⁺²	110,03	cd	NH ₄ ⁺	104,39	bcde	Ba ⁺²	133,72	bc
Co ⁺²	106,77	cde	Fe ⁺²	103,89	cde	Ca ⁺²	131,13	bc
NH ₄ ⁺	102,51	cdef	Mg ⁺²	103,58	cde	NH ₄ ⁺	127,86	bc
EDTA	100,69	def	PMSF	102,43	cde	Cu ⁺²	127,02	bc
Controle	100,00	def	Controle	100,00	de	Mg ⁺²	126,10	bcd
Mg ⁺²	96,85	defg	Co ⁺²	91,98	de	EDTA	116,11	cde
PMSF	91,35	efg	EDTA	90,88	ef	Pb ⁺²	112,86	cde
Cu ⁺²	89,67	fg	Pb ⁺²	80,77	ef	SDS	101,98	de
Zn ⁺²	80,85	g	Cu ⁺²	65,98	fg	PMSF	101,48	de
SDS	52,23	h	Zn ⁺²	55,31	g	Controle	100,00	e
Hg ⁺²	0,00	i	SDS	0,00	h	Zn ⁺²	95,28	e
Pb ⁺²	0,00	i	Hg ⁺²	0,00	h	Hg ⁺²	15,85	f

Nota: Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey.

(1) DMS 5% = 16,41200 e Coeficiente de variação = 5,646%

(2) DMS 5% = 25,16783 e Coeficiente de variação = 9,188%

(3) DMS 5% = 24,85123 e Coeficiente de variação = 6,736%

Outros íons e substâncias também tiveram efeito ativador ou inibidor na atividade das xilanases I e II e nas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*, como pode ser verificado na Tabela 13 e Figura 24, porém não diferiram estatisticamente ($\alpha = 0,05$) do controle pelo teste de Tukey. De acordo com Dutta et al. (2007), o efeito ativador de alguns agentes deve ocorrer devido a alterações na conformação estrutural da enzima. A enzima pode ser modulada pela interação de cátions com resíduos de aminoácidos envolvidos no seu sítio

ativo. Esse tipo de interação pode ser uma modulação positiva, que aumenta a atividade da enzima ou uma modulação negativa, que diminui a atividade enzimática (Dutta et al., 2007).

A inibição da atividade de xilanases por Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} e Pb^{+2} também é relatada no trabalho de Kansoh e Nagieb (2004) para xilanases de *Streptomyces galbus*. Porém, diferente do observado no presente trabalho, onde o Mn^{+2} teve um efeito ativador da atividade da xilanase I (27%) e da xilanase II (79%), Kansoh e Nagieb (2004) observaram uma completa inibição da atividade de xilanase desse microrganismo na presença de Mn^{+2} . Rani e Nand (2001); Saha (2002) também observaram inibição da atividade de xilanase, respectivamente, de *Clostridium absonum* e *Fusarium proliferatum* por Mn^{+2} . Por outro lado, Carmona et al. (2005) observaram efeito ativador do Mn^{+2} e DTT para a xilanase II de *Aspergillus versicolor*. A ativação pelo DTT também foi verificado por Silva (2006) para as xilanases I e II de *Trichoderma inhamatum* e por Rani e Nand (2001) para a xilanase II de *Clostridium absonum*.

A ativação das xilanases I e II por DTT em 75% e 100%, respectivamente e a total inibição da atividade da xilanase I e inibição em 84% da atividade da xilanase II por Hg^{+2} (Tabela 13), indicam a presença de grupos tiol da cisteína (Scopes, 1994) no sítio ativo dessas enzimas. A alta atividade enzimática na presença de agentes protetores dos grupos tiol pode ser explicada pela prevenção da oxidação dos grupos sulfidril, indicando uma relação entre a forma reduzida da cisteína (resíduo de meia-cistina) (VOET; VOET; PRATT, 2002) e a atividade de xilanases.

A presença de EDTA não afetou significativamente a atividade das xilanases presentes no filtrado de cultura, nem as xilanases purificadas I e II, uma vez que pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), não diferiram do controle (Tabela 13), o que sugere que íons metálicos não são requeridos para a atividade dessas enzimas. Porém, pode se observar um pequeno efeito estimulador da atividade da xilanase II na presença de EDTA. Esse agente quelante pode ter retirado do meio algum metal que estivesse inibindo a atividade dessa xilanase e assim um estímulo da atividade foi observado.

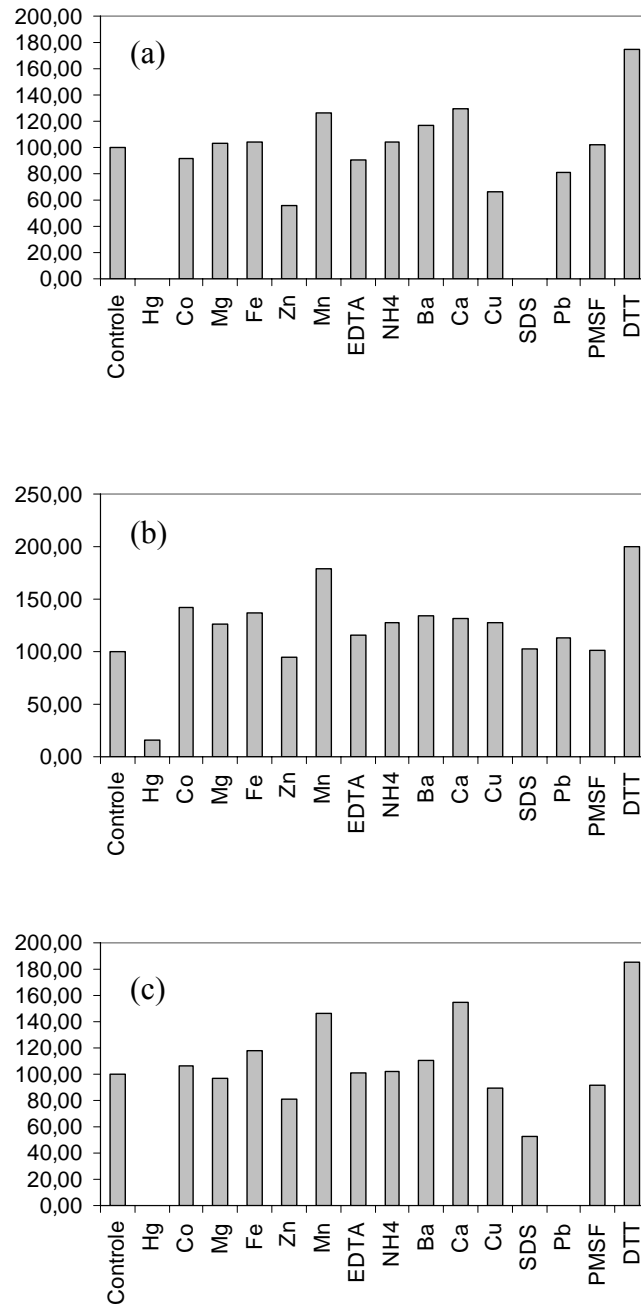


Figura 24 – Efeito de íons metálicos e outras substâncias na atividade das xilanases I (a), II (b) e do complexo xilanolítico (c) produzido pela linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

5.10 Parâmetros cinéticos

Para todas as xilanases estudadas no presente trabalho, o gráfico de hidrólise da xilana versus concentração do substrato foi uma hipérbole indicando cinética de Michaelis-Menten. Os valores de K_m (Figura 25 e 26) encontrados para as xilanases presentes no filtrado de cultura ($K_m = 23,16 \text{ mg/mL}$) e para as xilanases purificadas I ($K_m = 12,14 \text{ mg/mL}$) e II ($K_m = 39,32 \text{ mg/mL}$) encontram-se dentro do intervalo de 0,15 a 49,5 mg/mL observado por Beg et al. (2001) para xilanases de fungos. A baixa afinidade de xilanases pelo substrato xilana de *oat spelt* também é relatada por Silva (2006) para as xilanases I e II de *Trichoderma inhamatum* e por Silveira et al. (1999) para xilanases de *Trichoderma harzianum*, em ambos os trabalhos a afinidade por xilana de *birchwood* foi maior quando comparada à xilana de *oat spelt*. As xilanases purificadas de *Clostridium absonum* por Rani e Nand (2001) também mostraram maior afinidade por xilanas menos ramificadas (*birchwood* e *larchwood*) do que por xilana de *oat spelt*.

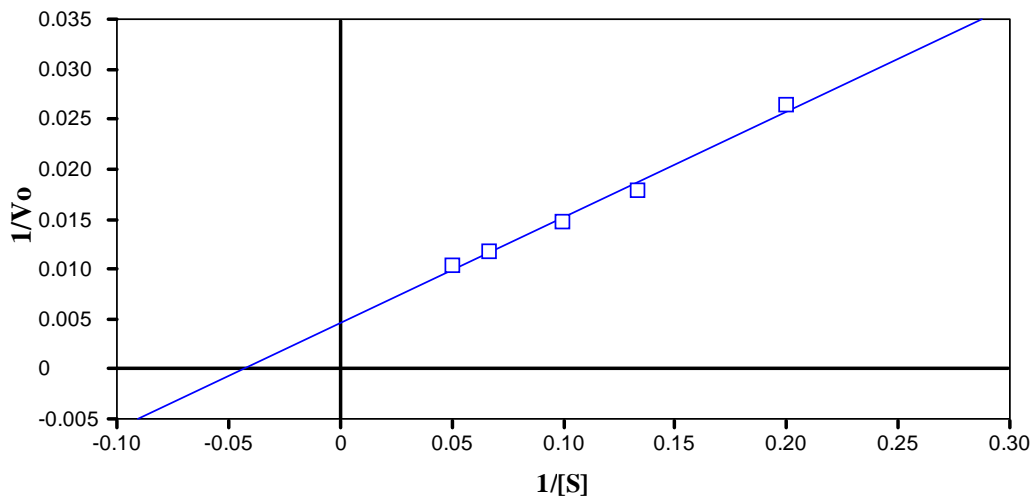


Figura 25 – Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ das xilanases presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Reação enzimática conduzida em pH 5,5 a 40°C por 20min. V_o em $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ e $[S]$ = concentração de xilana de *oat spelt* em mg/mL

As velocidades máxima de reação (Figuras 25 e 26) para as xilanases presentes no filtrado de cultura ($V_{m\acute{a}x} = 218,65 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ou $9,074 \text{ U}/\mu\text{g}$ de proteína), para a xilanase I ($V_{m\acute{a}x} =$

101,10 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ou 7,75 U/ μg de proteína) e para a xilanase II ($V_{\text{máx}} = 349,75 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ou 1579,62 U/ μg de proteína) são muito altas quando comparadas a outras xilanases microbianas, como pode ser observado na Tabela 2. Uma $V_{\text{máx}}$ mais alta do que a relatada por outros pesquisadores também foi observada por Sriprang et al. (2006) usando xilana de *birchwood* como substrato para determinação da $V_{\text{máx}}$ da xilanase de *Aspergillus niger* clonada e superexpressada em *Escherichia coli*.

A alta $V_{\text{máx}}$ encontrada no presente trabalho pode ter sofrido influência da temperatura e tempo de reação utilizados. A temperatura ótima de reação para todas as xilanases foi superior aos 40°C, utilizado nos experimentos para determinação do $V_{\text{máx}}$, como demonstrado na Figura 19, assim a atividade das xilanases provavelmente não foi máxima. O tempo de reação utilizado, 20 min (tempo padrão nos experimentos com xilanases no laboratório), é superior aos 5 min recomendado por Bailey, Biely e Poutanen (1992). A velocidade de conversão do reagente (xilana) em produto diminui com o tempo do ensaio, devido à diminuição da concentração de reagentes, ao aumento da concentração de produtos e/ou pela instabilidade da enzima nas condições do experimento.

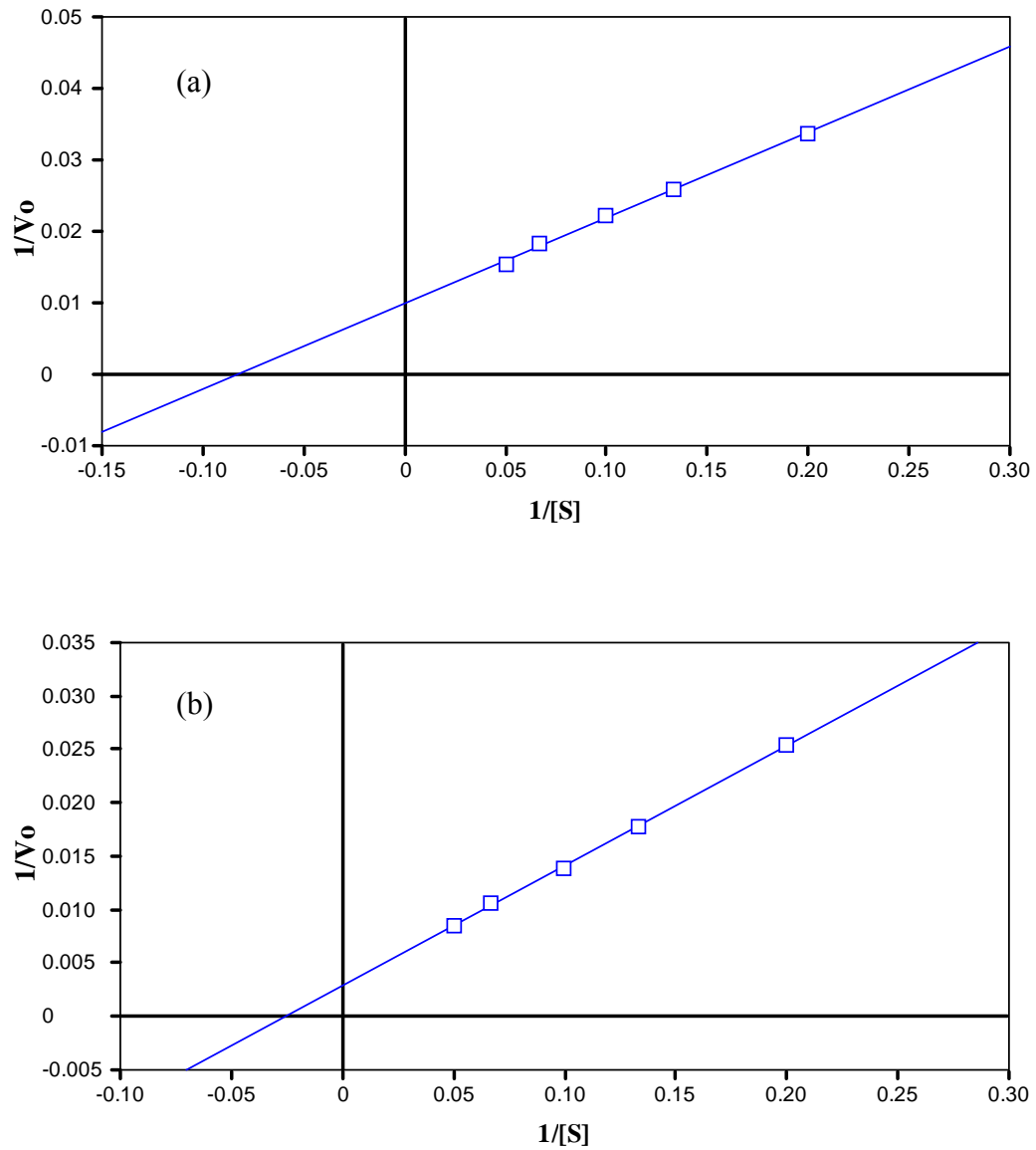


Figura 26 – Gráfico de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{\max} das xilanases I (a) e II (b) da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*

Nota: Reação enzimática conduzida em pH 5,5 a 40°C por 20 min. V_o em $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ e $[S]$ = concentração de xilana de *oat spelt* em mg/mL

5.11 Polpação do pseudocaule da bananeira

O pseudocaule da bananeira apresenta elevada umidade. Após seco a 50°C até peso constante, o teor de umidade foi determinado em 94%. As amostras de pseudocaule, secas a 50°C, foram absolutamente secas (a.s.) (secas em estufa a 105°C ± 3°C até peso constante) e foi encontrado um teor de umidade de 8,98%. Silva (1998) também encontrou um elevado teor de umidade (94%) para pseudocaules de bananeira. De acordo com Jarman et al. (1977) o teor de água do pseudocaule de bananeira varia de 90 a 96% e segundo Fernandes, Unkalkar e Meshramkar (1981) apud Silva (1998), esse elevado teor de umidade é um dos principais entraves na utilização do pseudocaule de bananeira, uma vez que encarece o transporte e facilita a deterioração durante o armazenamento, prejudicando o branqueamento e as propriedades de resistência da polpa.

O Brasil possui uma grande área cultivada com bananas, com uma produção em 2005 de 6,7 milhões de toneladas (FAOSTAT data 2006a), gerando grande quantidade de resíduos – 1,016 milhões de toneladas em 2003 (FAOSTAT data 2006a), que se não forem utilizados entrarão em senescência, possibilitando a proliferação de pragas da bananeira, microrganismos e animais peçonhentos. Silva (1998) sugere que a polpa do pseudocaule de bananeira serve para confecção de um papel especial, utilizado na restauração de documentos. Dessa forma, apesar do baixo rendimento em peso seco do pseudocaule de bananeira, a utilização dessa matéria prima, especialmente na Região do Vale do Ribeira (SP), pode contribuir como fonte de renda para essa população, além de reduzir o impacto desse resíduo no campo.

Além do elevado teor de umidade, Silva (1998) verificou um elevado teor de extrativos para pseudocaules de bananeira. Cordeiro et al. (2004) encontraram 14,1% de extrativos em água e álcool/tolueno para pseudocaules de *Musa acuminata*. Outros materiais não-madeira, também possuem elevado teor de extrativos. Segundo Soffner (2001), o teor de extrativos do bagaço obtido do engaço de bananeira é 47%. Em caules de *Arundo donax* L. (cana-do-reino), Shatalov, Quilhó e Pereira (2001) determinaram em 12,1% o teor de extrativos.

Silva (1998) verificou que a pré-hidrólise do pseudocaule da bananeira removeu células de parênquimas, de elementos de vasos e de substâncias solúveis, como taninos, substâncias pécnicas, gomas e materiais mucilaginosos, tornado a fração fibrosa do pseudocaule mais semelhante à das madeiras. Segundo Soffner (2001) a pré-extração aquosa eliminou 40,54% dos

extrativos encontrados no engaço da bananeira. Como os extrativos dificultam a polpação, uma vez que consomem álcali e como consequência têm-se uma polpa com menor qualidade, optou-se no presente trabalho por realizar uma pré-hidrólise aquosa anteriormente à polpação kraft.

Como relato por Silva (1998) o rendimento de fibras após o tratamento de pré-hidrólise é pequeno. No presente trabalho, após a pré-hidrólise do pseudocaule de bananeira obteve-se somente 34% de material fibroso (Tabela 14), valor inferior aos 50,7% encontrado por Silva (1998).

Após a pré-hidrólise, a fração fibrosa (Figura 27(e)) foi utilizada para produção de polpa celulósica (Figura 27(f)) utilizando o processo kraft. Inicialmente, testaram-se quatro diferentes cargas de álcali ativo visando determinar a melhor concentração para se obter um bom rendimento de polpa com número Kappa baixo. Como pode ser observado na Tabela 14, o número Kappa obtido para todas as cargas de álcali foram baixos, demonstrando uma boa deslignificação com rendimento aproximado em 50%. Resultados similares foram apresentados por Silva (1998), que obteve um rendimento de 50,7% e número Kappa de 16,6 após polpação kraft (com uma carga de álcali ativo de 20%) da fração fibrosa do pseudocaule de bananeira, obtida após pré-hidrólise com água. De acordo com os resultados apresentados por Cordeiro et al. (2004), os pseudocaulos de *Musa acuminata* apresentaram dificuldade de deslignificação, apresentando elevado número Kappa (> 30,5) em todos os tratamentos.

Tabela 14 – Característica da fração fibrosa, polpa e licores residuais obtidos da pré-hidrólise e polpação kraft do pseudocaule de bananeira

	Fração Fibrosa/ Polpa		Licor Residual	
	Rendimento (%)	Número Kappa	Sólidos (%)	pH
Pré-hidrólise	34	–	4,234	5,87
Polpação kraft				
Álcali 16%	49,2	12,8	9,175	10,05
Álcali 18%	47,7	12,0	8,227	10,39
Álcali 20%	50,0	12,2	8,704	10,85
Álcali 22%	50,4	12,3	9,224	12,26



Figura 27 – Pré-hidrólise e polpação kraft do pseudocaulo da bananeira. (a) Autoclave rotativa de oito cápsulas (Regmed) usada no processo de pré-hidrólise e polpação kraft; (b) Pedacos do pseudocaulo após pré-hidrólise, (c) Pseudocaulo após pré-hidrólise e desintegração em liquidificador industrial, (d) Rejeito da pré-hidrólise (mucilagem, células etc.), (e) Fração fibrosa obtida após pré-hidrólise e retirada dos rejeitos, (f) Polpa celulósica do pseudocaulo da bananeira obtida pelo processo kraft com carga de álcali ativo de 16%

Pelos resultados obtidos com diferentes cargas de álcali, decidiu-se usar uma carga de álcali de 16% para se obter a polpa para os experimentos de branqueamento enzimático. Porém,

após a polpação com maior quantidade de material, o número Kappa obtido para a polpa foi de 27,8, valor muito superior aos 12,8 encontrado anteriormente (Tabela 14). Diferenças na coloração do papel feito com as duas polpas podem ser verificadas na Figura 28. Assim, com o objetivo de reduzir o número Kappa, essa nova polpa foi depurada.

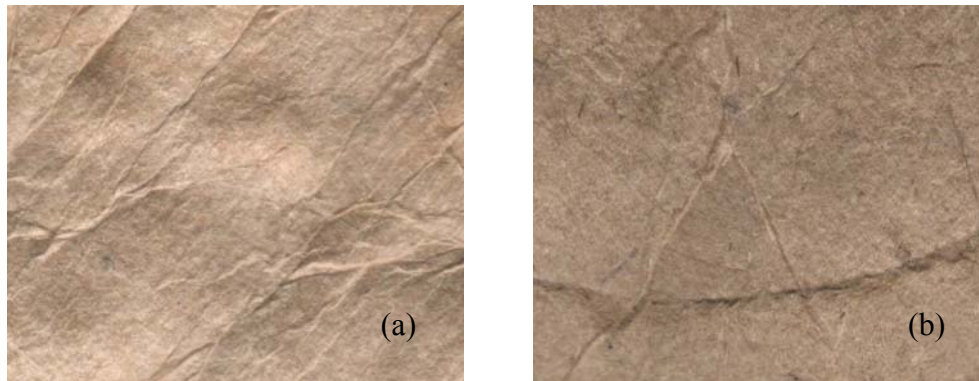


Figura 28 – Papel obtido após filtração da polpa em funil de Büchner (a) Polpa kraft obtida a partir de pseudocaulis colhidos em dezembro de 2006, (b) Polpa kraft obtida a partir de pseudocaulis colhidos em julho de 2007

Na Tabela 15 estão apresentados o rendimento bruto, rendimento depurado e o número Kappa da polpa obtida com maior quantidade de material, pelo processo kraft com carga de álcali ativo de 16%.

O número Kappa mais alto obtido no segundo cozimento (Tabela 15) deve ser o resultado da colheita dos pseudocaulis, do primeiro e segundo cozimento, em épocas distintas. O pseudocaulis usado no primeiro cozimento foi colhido em dezembro de 2006, seco e estocado até julho de 2007, quando se realizou os experimentos de polpação. Verificando-se o baixo rendimento, foi necessário colher novos pseudocaulis, que dessa forma foram colhidos em julho de 2007, secos e usados em seguida para o segundo cozimento após serem misturados com a amostra que não foi utilizada no primeiro cozimento. Provavelmente, as características dos pseudocaulis colhidos em dezembro de 2006 e julho de 2007 eram distintas, alterando os resultados de polpação do primeiro para o segundo cozimento. O tempo de estocagem de seis meses do material colhido em dezembro de 2006 pode ter facilitado a polpação, devido à hidrólise natural ou mesmo degradação de compostos por microrganismos. A degradação desses compostos pode ter facilitado a ação dos reagentes químicos utilizados para a polpação.

Tabela 15 – Rendimento bruto, depurado e número Kappa da polpa obtida pelo processo kraft com carga de álcali ativo de 16% e pseudocaules colhidos em julho de 2007

Polpa bruta		Polpa depurada	
Rendimento bruto (%)	Número Kappa	Rendimento depurado (%)	Número Kappa
51,5	27,8	50,2	21,9

Um outro problema verificado na polpação de pseudocaules de bananeira é o baixo teor de sólidos do licor residual obtido após a pré-hidrólise e polpação kraft (Tabela 14). Segundo Silva (1998), os teores de sólidos normalmente obtidos de licores provenientes de polpação de madeira estão em torno de 16% e segundo esse pesquisador o baixo teor de sólidos no licor residual é desvantajoso, uma vez que irá requerer evaporação de maior volume de água, onerando o processo de recuperação. Silva (1998) ainda cita vários trabalhos que mostram o problema de recuperação do licor proveniente de polpação kraft de materiais não-madeira, devido ao baixo poder calorífico, ocasionado pelo alto teor de substâncias minerais, e baixo teor de lignina e holocelulose no licor.

5.12 Efeito das xilanases purificadas e do complexo xilanolítico na liberação de cromóforos e açúcares redutores da polpa de pseudocaule de bananeira

O branqueamento da polpa geralmente está correlacionado à liberação de cromóforos da polpa (ELEGIR; SYKES; JEFFRIES, 1995), uma vez que a liberação dessas moléculas sugere que ocorreu a dissociação do complexo carboidrato-lignina da fibra (NINAWA; KUHAD, 2006). Assim, o potencial de branqueamento da polpa de pseudocaule de bananeira, pelas xilanases purificadas I e II e pelas xilanases presentes no filtrado de cultura, foi avaliado por meio da liberação de moléculas cromóforas, com espectro de absorção em 237 nm, 254 nm (compostos aromáticos), 280 nm (lignina) e 465 nm (compostos hidrofóbicos).

Baseado no espectro de absorção a 237 nm sugere-se que a xilanase II teve um comportamento parecido com as enzimas presentes no filtrado de cultura, apresentando um aumento significativo na liberação de moléculas com absorção a 237 nm devido ao aumento da concentração enzimática (Figura 29). A absorbância a 237 nm foi menor para a xilanase II, indicando que menos cromóforos foram liberados por essa xilanase, porém sua equação de

regressão foi ajustada linearmente (Prob. > F = 0,00004) indicando que se maiores concentrações de xilanase II fossem usadas, uma maior absorbância seria encontrada. Já as equações de regressão para as enzimas presentes no filtrado de cultura e para a xilanase I tiveram um ajuste quadrático, respectivamente Prob. > F = 0,03843 e 0,01865. O ajuste quadrático para a xilanase I indica que o aumento da concentração enzimática acima de 10U/ g polpa de polpa a.s. não aumenta significativamente ($\alpha = 0,05$) a liberação de moléculas cromóforas com absorção em 237nm.

A maior eficiência na liberação de compostos com absorção a 237nm pela xilanase I em relação à xilanase II pode ser atribuída à menor massa molecular da xilanase I. Segundo Elegir, Szakacs e Jeffries (1994), enzimas menores têm um maior poder de penetração na estrutura da parede da fibra e assim alteram mais eficientemente as propriedades da polpa. Baraznenok et al. (1999) obtiveram resultados que concordam com os do presente estudo. Baseado na absorbância a 237nm, a xilanase de *Chaetomium cellulolyticum* apresentou maior efeito de branqueamento, sendo que a xilanase com maior tamanho (57 kDa) foi a que apresentou o menor efeito de branqueamento na polpa kraft em pH 7,0. Observaram ainda que em pH 7,0, a xilanase com 47 kDa teve um efeito mediano e similar ao encontrado para a enzima comercial Ecopulp TX 200. Sandrim et al. (2005) também observaram que a xilanase II de *Aspergillus caespitosus* apresentou menor massa molecular que a xilanase I, foi mais efetiva para o branqueamento da polpa, reduzindo o número Kappa em 12,6% enquanto a xilanase I reduziu em 1,7%.

Baraznekok et al. (1999) relatam que a liberação de materiais com absorbância a 237nm aumenta com o incremento da dose da xilanase com tamanho de 25 kDa de *Chaetomium cellulolyticum*, sugerindo que a enzima e não outro fator é responsável por esse aumento. Dados similares foram encontrados no presente trabalho para as enzimas presentes no filtrado de cultura, nas concentrações acima de 5 U/g de polpa a.s. (ajuste quadrático da equação de regressão) e para a xilanase II.

Patel, Grabski e Jeffries (1993) observaram materiais com espectro de absorção em 205, 237 e 275nm, oriundos de polpas tratadas com xilanases de *Streptomyces roseiscleroticus* e correlacionaram a alvura da polpa com a absorbância a 237nm. Elegir, Sykes e Jeffries (1995) mostram que a liberação de materiais que absorvem a 237nm está correlacionada com a liberação da cor e aumento da alvura da polpa após branqueamento. Dessa forma, acredita-se que na concentração de 10 U/g de polpa a.s., as enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem

IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum* e a xilanase I purificada nesse trabalho são mais eficientes para incrementar a alvura da polpa e facilitar a deslignificação do que a xilanase II. Porém, provavelmente o aumento da concentração enzimática para valores acima de 25 U/g de polpa a.s., permitirá concluir que as enzimas presentes no filtrado de cultura são mais eficientes do que a xilanase I, uma vez que não houve diferença significativa entre 10 e 25 U/g de polpa a.s. para essa isoforma, mas diferenças significativas entre essas concentrações foram observadas para as enzimas presentes no filtrado de cultura.

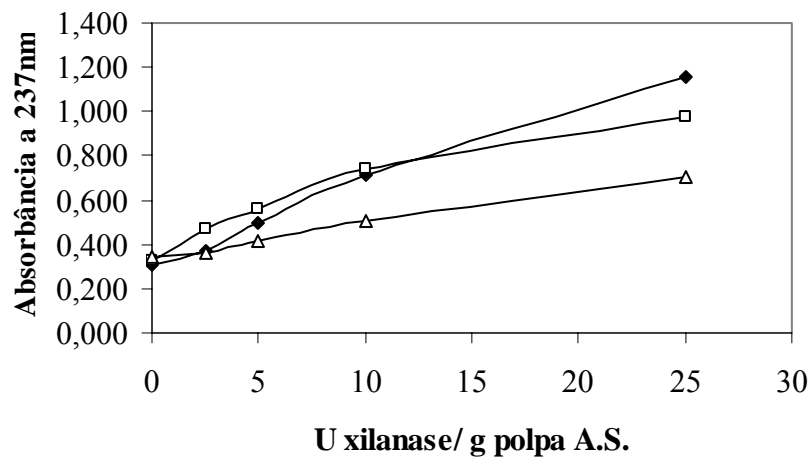


Figura 29 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaule de bananeira com espectro de absorção em 237nm

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 6,927%); Xilanase I (C.V. = 9,536%); Xilanase II (11,147%)

Através da absorbância a 254 nm (Figura 30) foi observada liberação de cromóforos somente pelas enzimas presentes no filtrado de cultura e pela xilanase I, sendo a equação da reta ajustada linearmente, respectivamente Prob. > F = 0,00001 e Prob. > F = 0,00049, indicando um incremento na liberação de cromóforos ocasionada pelo aumento da concentração enzimática usada. Porém, observa-se na Figura 30 que a liberação de cromóforos com espectro de absorção a 254 nm foi muito maior usando-se as enzimas presentes no filtrado de cultura do que a xilanase I. Para as concentrações de xilanase II não foi encontrada diferença estatística significativa considerando um $\alpha = 0,05$ (Prob. > F = 0,44413).

A maior eficiência da liberação de compostos cromóforos (absorção a 254 nm) pelas enzimas presentes no filtrado de cultura, pode ter ocorrido devido à presença de outras enzimas, que não são xilanases. De acordo com Kansoh e Nagieb (2004), xilanase foi mais efetiva no branqueamento de papel do que manase, porém quando usadas juntas e simultaneamente, as duas enzimas foram capazes de aumentar a liberação de açúcares redutores e melhorar a branqueabilidade da polpa, possivelmente como resultado de uma quase interação aditiva.

Outra hipótese para a baixa liberação de compostos cromóforos (absorbância em 254 nm) pelas xilanases purificadas I e II é a necessidade de ação sinérgica entre essas isoformas, uma vez que quando presentes juntas no filtrado de cultura, aumentaram a liberação desse tipo de molécula. Xilanases purificadas por Patel, Grabski e Jeffries (1993) apresentaram habilidades diferentes para liberar cromóforos e reduzir o número Kappa, enquanto as Xyl2 e Xyl3 liberaram maior quantidade de compostos cromóforos, a Xyl4 foi mais efetiva na facilitação de redução do número Kappa. Isoenzimas endoxilanolíticas de *Streptomyces* sp. também exibiram capacidades diferentes no branqueamento de polpa kraft (ELEGIR; SYKES; JEFFRIES, 1995).

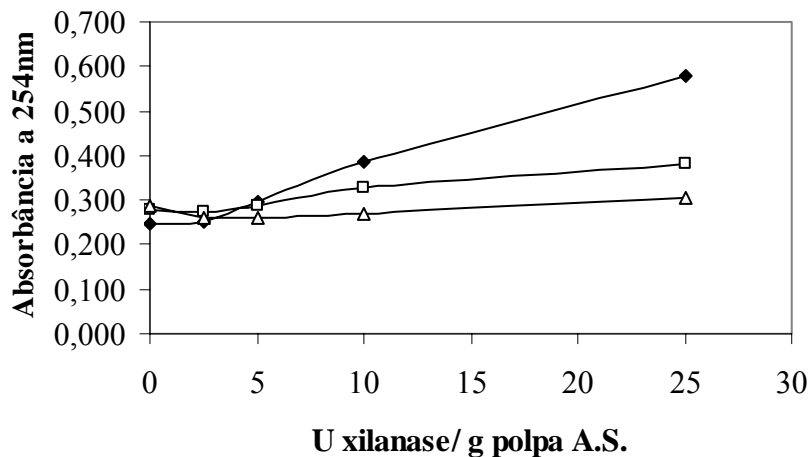


Figura 30 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaule de bananeira com espectro de absorção em 254nm

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 8,538%); Xilanase I (C.V. = 7,901%); Xilanase II (14,374%)

De acordo com Chen et al. (1997) compostos derivados da lignina podem ser monitorados a 280 nm. Porém, Patel, Grabski e Jeffries (1993) caracterizaram parcialmente a natureza dos compostos cromóforos liberados por xilanases de *Streptomyces roseiscleroticus* de polpa kraft e segundo eles, o espectro de absorção não corresponde ao espectro característico para lignina, que não possui pico de absorção a 280 nm, entretanto, sugerem que o pico de absorção a 270nm é similar e pode representar esse tipo de material.

Somente as enzimas presentes no filtrado de cultura apresentaram aumento significativo da absorbância a 280 nm (Figura 31), sendo a equação da reta ajustada linearmente (Prob. > F = 0,00001). Para as xilanases I e II as Prob. > F foram respectivamente 0,06362 e 0,14970. Xilanases de *Streptomyces thermoviolaceus* liberaram compostos cromóforos com absorbância a 280 nm e açúcares redutores de polpa kraft de *birchwood*, apresentando um efetivo estímulo no branqueamento e redução do consumo de cloro (GARG; ROBERTS; McCARTHY, 1998). Jiang et al. (2006) observaram que o número Kappa de polpas de palha de trigo foi reduzido com o aumento da carga de xilanase B de *Thermotoga maritima* até 10 U/g; maiores quantidades de enzima não reduziram o número Kappa, porém um aumento da absorção a 280nm foi observado, indicando que os produtos de degradação dos carboidratos também contribuem para a coloração do material.

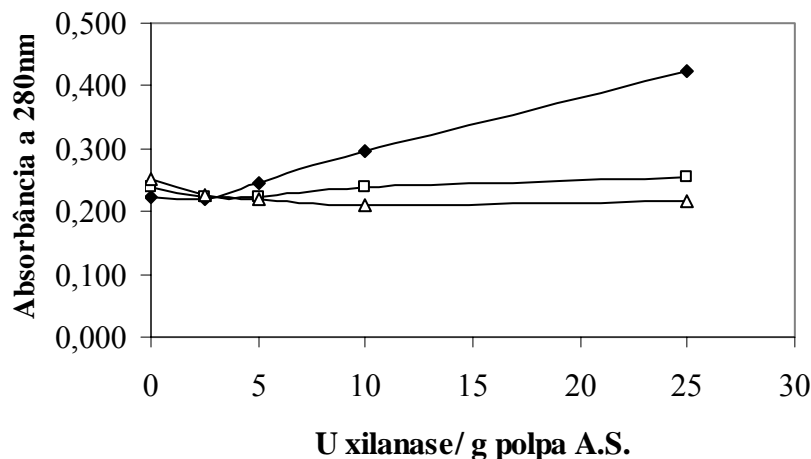


Figura 31 - Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaule de bananeira com espectro de absorção em 280nm

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 7,957%); Xilanase I (C.V. = 6,285%); Xilanase II (C.V. = 11,933%)

A liberação de compostos com absorção em 465 nm só foi observada pelo uso das enzimas presentes no filtrado de cultura (Figura 32). Portanto, as xilanases I e II que não liberaram compostos da polpa com absorção em 280 nm, também não liberaram compostos com espectro de absorção em 465nm (respectivamente, Prob. > F = 0,80094 e Prob. > F = 0,28842). Para as enzimas presentes no filtrado de cultura, observou-se um aumento da absorbância com o aumento da concentração enzimática usada, sendo significativo ($\alpha = 0,05$) o ajuste linear da regressão (Prof. > F = 0,00033). A liberação de produtos com absorção a 465 nm, por xilanases de *Penicillium corylophilum* e *Trichoderma longibrachiatum* não foi correlacionada com a liberação de material cromóforo (absorção a 237, 254 e 280 nm) (MEDEIROS et al., 2007). No presente trabalho, também não foi observada correlação entre a liberação pelas xilanases I e II de compostos com absorção a 465 nm e compostos com absorção a 237 nm. Resultados diferentes desses foram observados por Sandrim et al. (2005), que relatam que as duas enzimas de *Aspergillus caespitosus* reduziram o número Kappa e liberaram grande quantidade de material com absorção a 237 e 465nm.

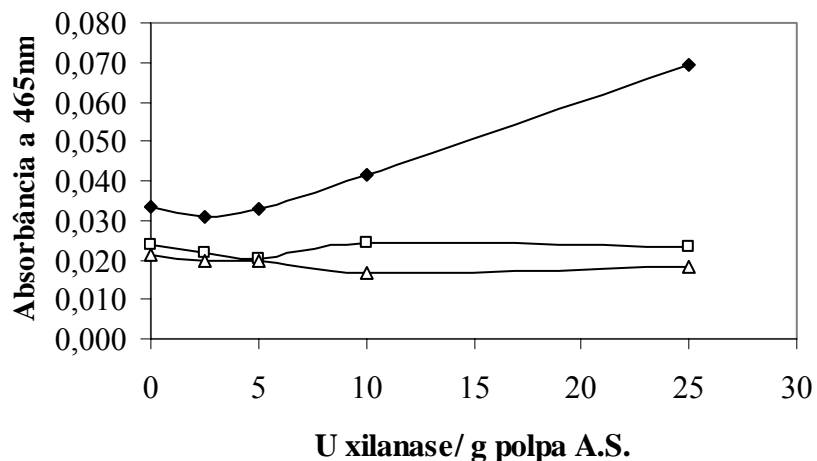


Figura 32 – Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaule de bananeira com espectro de absorção em 465nm

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 19,068%); Xilanase I (C.V. = 20,190%); Xilanase II (C.V. = 20,181%)

A liberação de açúcares redutores da polpa de pseudocaule de bananeira foi observada pela ação das enzimas presentes no filtrado de cultura e pelas xilanases I e II (Figura 33). Um incremento da liberação dos açúcares redutores com o aumento da concentração de enzima usada foi observada nos três tratamentos, observando-se um ajuste quadrático para as enzimas presentes no filtrado de cultura (Prob. > F = 0,00006) e para a xilanase I (Prof. > F = 0,02167) e um ajuste cúbico para a xilanase II (Prof. > F = 0,00037). Liberação de açúcares redutores de polpas também foram observadas por Chauhan et al. (2006) usando xilanases de *Bacillus coagulans* e por Medeiros et al. (2007) usando xilanases de *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, porém as xilanases desses dois últimos microrganismos liberaram menor quantidade de açúcares redutores em relação ao *P. corylophilum*.

Elegir, Sykes e Jeffries (1995) observaram que a xyl3 de *Streptomyces* sp. liberou aproximadamente duas a três vezes mais açúcares redutores que a xyl1a; resultados similares só foram observados no presente trabalho quando foram usadas menores concentrações (2,5 e 5 U/g polpa a.s) das xilanases de *Penicillium chrysogenum* (Figura 33).

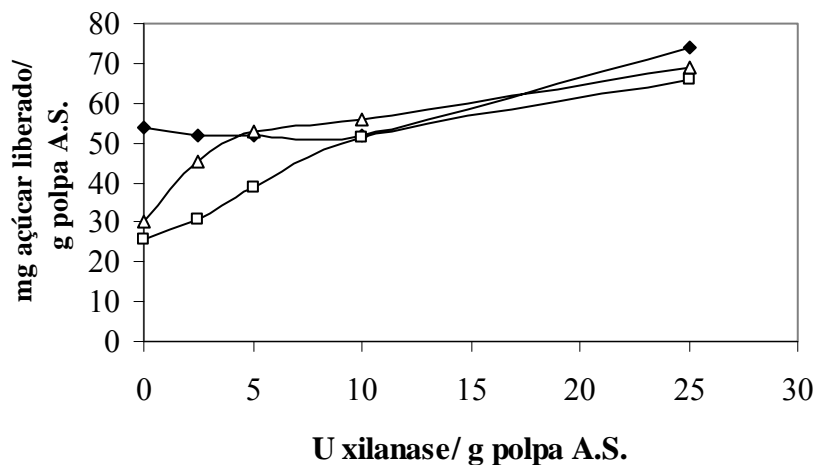


Figura 33 - Efeito de diferentes concentrações do complexo enzimático (◆) e das xilanases parcialmente purificadas I (□) e II (Δ) na liberação de açúcares redutores da polpa de pseudocaule de bananeira

Nota: Médias originais. Filtrado de cultura (C.V. = 3,138%); Xilanase I (C.V. = 11,818%); Xilanase II (C.V. = 4,625%)

Como as enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* foram as únicas capazes de liberar cromóforos em todos os comprimentos de onda avaliados, essas foram usadas na concentração de 25 U/g de polpa a.s. visando a otimização do tempo de reação entre a enzima e a polpa.

O tempo de reação da enzima com a polpa de pseudocaule de bananeira mostrou um efeito significativo na liberação de compostos crómoforos com absorção em 237 nm, 254 nm, 280 nm e 465 nm, sendo as regressões ajustadas por equações de terceiro grau (respectivamente, Prob. > F = 0,00022; 0,00103; 0,00433 e 0,04863) indicando alterações significativas ($\alpha = 0,05$) em três pontos da escala de tempo estudada. A maior liberação de compostos cromóforos ocorreu nos primeiros 30 min de reação, um aumento mais leve, porém significativo foi observado de 30min a 1h e de 1h a 3h (Figura 34). As xilanases de *Thermotoga marítima* apresentaram uma ação mais efetiva, avaliada pela liberação de cromóforos (absorção a 237, 254, 280 e 465 nm) e açúcares redutores, em até uma hora de reação com polpa de palha de trigo (JIANG et al., 2006). Garg, Roberts e McCarthy (1998) usando 10U de diferentes xilanases observaram que a liberação de cromóforos da polpa kraft de *birchwood* é completa após 2h de tratamento. Resultados similares aos de Garg, Roberts e McCarthy (1998) foram encontrados por Ninawe e Kuhad (2006) que observaram que a eficiência da xilanase de *Streptomyces cyaneus* para redução do número Kappa foi máxima após duas horas de tratamento, sendo que a liberação de compostos cromóforos também foi máxima após duas horas. Shah et al. (1999) também verificaram que duas horas de tratamento com xilanases de *Bacillus* sp. são suficientes para liberação de compostos com absorção em 280 nm e 465 nm, açúcares redutores e redução do número Kappa. Porém, Salles et al. (2005) observou máxima liberação de compostos cromóforos e hidrofóbicos após três horas de tratamento da polpa com xilanases de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, já para que a xilanase de *Acrophialophora nainiana* liberasse ao máximo esses compostos, foram necessários quatro horas de reação.

Como observado por Medeiros et al. (2007), para todas as amostras de xilanases, a maior liberação de cromóforos da polpa foi observada a 237 nm (Figuras 29 a 34).

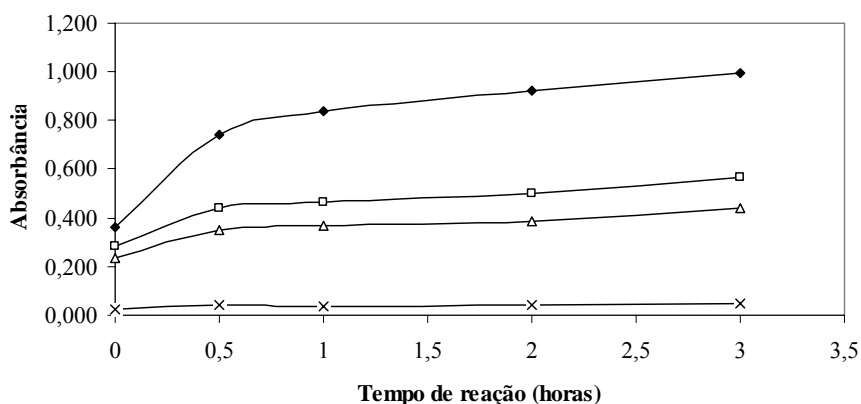


Figura 34 - Efeito de diferentes tempos de reação na liberação de material cromóforo da polpa de pseudocaule de bananeira, usando enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*. (◆) 237nm, (□) 254nm, (Δ) 280nm, (X) 465nm

Nota: Médias originais. 237nm (C.V. = 4,725%); 254nm (C.V. = 5,171%); 280nm (C.V. = 6,081%) e 465nm (C.V. = 10,374%)

Para que a utilização das xilanases presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 e das xilanases purificadas (I e II) seja mais eficiente, sugere-se que estudos de cinética enzimática sejam conduzidos.

De acordo com Garg, Roberts e McCarthy (1998), a liberação de cromóforos é provavelmente o melhor indicador da cinética do ataque das enzimas na polpa, uma vez que os açúcares redutores continuarão sendo gerados pela hidrólise enzimática de oligossacarídeos liberados pela despolimerização inicial da xilana presentes na superfície das fibras.

A xilana tem uma distribuição heterogênea na polpa e está localizada tanto na superfície das fibras como na matriz da polpa. Grande quantidade da xilana está ligada a outras hemiceluloses e lignina, que naturalmente estão presentes na polpa. Assim, de acordo com Dimitrov, Valchev e Valcheva (2005), a equação de Michaelis-Menten é inadequada para descrever a cinética da decomposição catalisada pela enzima. Segundo esses pesquisadores a equação topoquímica Prout-Tompkins(P-T) modificada proporciona uma boa interpretação da cinética de ação da xilanase com referência para a estrutura e localização da xilana na matriz da polpa.

6 Conclusões

Apresenta-se a seguir uma síntese dos resultados obtidos, seguida da conclusão do trabalho e considerações adicionais:

- Para a linhagem IFO-4626 a melhor produção de xilanase usando como indutor xilana de *oat spelt* foi obtida no MMF após 60h de cultivo. O desempenho da linhagem M-85 só se iguala ao da IFO-4626 no tempo 72h, no MMH;
- A palha de cana-de-açúcar e a fibra de coco podem substituir a xilana de *oat spelt*, reduzindo custos de produção e gerando oportunidade de aproveitamento econômico desses resíduos. A palha de arroz não se mostrou um substrato adequado para tal objetivo. Entre esses resíduos, o de melhor desempenho foi a palha de cana-de-açúcar;
- A glicose (1%) é o melhor substrato para o crescimento da linhagem IFO-4626, em relação aos substratos xilose, galactose e carboximetilcelulose. Havendo somente esta última como fonte de carbono, não ocorre o crescimento do fungo. Tanto a xilose como a xilana induzem a síntese de xilanases. A presença de glicose (1%) ou de galactose (1%) inibe a síntese de xilanases em meio com xilana e não a induzem em sua ausência;
- Dois picos com atividade de xilanase foram obtidos após a eluição em uma coluna de troca aniônica DEAE-Sephacel. Uma xilanase (I) com massa molecular de 12,6 kDa, $K_m = 12,14 \text{ mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 7,75 \text{ U}/\mu\text{g}$ de proteína, não se ligou a resina e a outra (xilanase II), com massa molecular de 20 kDa, $K_m = 39,32 \text{ mg/mL}$ e $V_{m\acute{a}x} = 1579,62 \text{ mg/mL}$, foi eluída com 100 mM de NaCl, se obtendo uma recuperação de 14,19% e 12,64% e uma purificação de 1,5 e 75,77 vezes respectivamente para as xilanases I e II;
- O pH ótimo e a temperatura ótima de reação são 5,0 e 45°C para o complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura, 5,0 e 50°C para a xilanase I e pH 4,5 a 5,5 e temperatura de 40 a 50 °C para a xilanase II;
- Tanto o complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura, como a xilanase II, apresentaram boa estabilidade em valores de pH de 3,0 a 11,0. Já a xilanase I não apresentou atividade após permanecer por 24h em pH 3,0 e em pH maior que 9,5;

- O complexo xilanolítico presente no filtrado de cultura possui uma alta estabilidade a 40°C, já a meia-vida a 50°C é de 17,6 min. A meia vida a 40°C para a xilanase I foi de 133 min, com manutenção da estabilidade a 50% por até 198 min; uma boa estabilidade a 50°C foi observada para essa xilanase. A xilanase II apresentou boa estabilidade térmica a 40°C e a 50°C. Tanto as xilanases presentes no filtrado de cultura, como as xilanases purificadas não apresentaram estabilidade térmica a 60°C;
- As xilanases presentes no filtrado de cultura foram ativadas pela presença de Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} e DTT e inibidas pela presença de Zn^{+2} , SDS, Pb^{+2} e Hg^{+2} . A atividade da xilanase I foi ativada por DTT, Ca^{+2} e Mn^{+2} e inibidas por Cu^{+2} , Zn^{+2} , SDS e Hg^{+2} . Já a xilanase II foi inibida somente por Hg^{+2} . A ativação da xilanase II foi observada por diversos íons: Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} , além de NH_4^+ e DTT;
- Pseudocaules de bananeiras frutíferas são adequados a produção de polpa celulósica pelo processo kraft;
- A liberação de cromóforos com absorção em 237nm e açúcares redutores indicam que tanto as enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *Penicillium chrysogenum*, como as xilanases purificadas I e II possuem potencial de aumentar a branqueabilidade de polpa kraft de pseudocaules de bananeiras frutíferas;
- As enzimas presentes no filtrado de cultura da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum* mostraram-se adequadas para liberação de cromóforos com absorção em 237nm, 254nm, 280nm e 465nm da polpa de pseudocaulo de bananeiras frutíferas, mesmo somente após 30 min de reação.

Pelos resultados apresentados, constatou-se que as enzimas presentes no filtrado de cultura possuem melhor potencial para favorecer o posterior branqueamento da polpa kraft de pseudocaules de bananeiras frutíferas do que as xilanases purificadas I e II. Isso é interessante do ponto de vista técnico e econômico, na medida em que reduz custos, ao dispensar a purificação e torna mais simples a operação do processo, ampliando suas aplicações.

Por outro lado, como um dos principais objetivos do uso de xilanases é a redução do consumo de compostos clorados, estudos mais detalhados necessitam ser feitos, avaliando-se a

ação das xilanases puras e das enzimas presentes no filtrado de cultura no tratamento da polpa dentro de uma seqüência de branqueamento.

Visando à otimização do tratamento da polpa de pseudocaule de bananeiras frutíferas e outras polpas celulósicas, por xilanases de *P. chrysogenum*, sugere-se que estudos de cinética enzimática sejam feitos com diferentes polpas, quantidades de enzima e tempos de reação, usando para tanto as condições ótimas de ação determinadas no presente estudo para as xilanases da linhagem IFO-4626 de *P. chrysogenum*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SATER, M.A.; EL-SAID, A.H.M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 47, n. 1, p. 15-21, Jan. 2001.

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. thermoidea. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 130, n. 2-3, p. 171-176, Aug. 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 10.004**: Classificação de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro, 1987. 48 p.

ATIK, C.; IMAMOGLU, S.; BERMEK, H. Impacto f xylanase pré-treatment on peroxide bleaching stage of biokraft pulp. **Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 58, n. 1, p. 22-26, July 2006

AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Nacional, 1973. 288p.

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

BAJPAI, P. Biological Bleaching of Chemical Pulps. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 1-58, Jan./Mar. 2004.

BARAZNENOK, V.A.; BECKER, E.G.; ANKUDIMOVA, N.V.; OKUNEV, N.N. Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 8-9, p. 651-659, Nov. 1999.

BARDI, P.M. **A Madeira desde o Pau-Brasil até a celulose**. São Paulo: Banco Sudameris, 1982. p. 88, 92, 94.

BASTAWDE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 353-368, July 1992.

BEG, Q.K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n.3-4, p. 326-338, Aug. 2001.

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

BIELY, P.; MACKENZIE, C.R.; PULS, J.; SCHMEIDER, H. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. **Bio/ Technology**, New York, v. 4, n. 8, p. 731-733, Aug. 1986.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic material: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, n. 2, p. 90-104, Apr. 1981.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.

BUCHHOLZ, K.; PULS, J.; GODELMANN, B.; DIETRICH, H.H. Hydrolysis of cellulosic wastes. **Process Biochemistry**, London, v. 16, n. 1, p. 37-43, 1981.

CARMONA, E.C. **Produção, purificação e caracterização de xilanase de *Aspergillus versicolor***. 1995. 111 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

CARMONA, E.C.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 311-315, Sept. 1998.

CARMONA, E.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MONTEIRO, R.T.R.; JORGE, J.A. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 387-394, Nov. 1997.

CARMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.; BROCHETO-BRAGA, M.R. JORGE, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 359–364, Jan. 2005.

CHAUHAN, S.; CHOUDHURY, B.; SINGH, S.N.; GHOSH, P. Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 1, p. 226-231, Jan. 2006.

CHEN, C.C.; ADOLPHSON, R.; DEAN, J.F.; ERIKSSON, K.E.; ADAMS, M.W.W.; WESTPHELING, J. Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermotoga maritima*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 20, n. 1, p. 39-45, Jan. 1997.

CORDEIRO, N.; BELGACEM, M.N.; TORRES, I.C.; MOURA, J.C.V.P. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. **Industrial Crops and Products**, v.19, n. 2, p. 147-154, Mar. 2004.

COUGHLAN, M.P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J.; VAN SOMEREN, M.A.K.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. (Ed.). **Xylan and xylanases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1992. p. 111-139. (Série Progress in Biotechnology, n. 7).

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

DAVID, C.; FORNASIER, R. Hidrolysis of cellulose and hemicellulose-valorization of lignine. A new pretreatment for lignocellulosic substrates. In: FERRERO, G.L; FERRANTE, M.P.; NAVEAU, H. **Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste**. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1984. p. 69-82.

DEKKER, R.F.H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic sacharification of hemicellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, n. 4, p. 1127-1146, 1983.

_____ Biodegradation of the hemicellulose. In: Higuchi, T. (Ed.). **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. Tokyo: Academic Press, 1985. p. 505-533.

_____ The hemicellulase group of enzymes. In: BLANSHARD, J.M.V.; MITCHEL, J.R. (Ed.). **Polyssacarides in food**. London: Butterworths, 1979. p. 93-108.

DEKKER, R.F.H.; RICHARDS, G.N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, v. 32, p. 277-532, 1976.

DELEYN, F.; CLAEYSSSENS, M.; VAN BEEUMEN, J.; DE BRUYNE, C.K. Purification and properties of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 56, n. 1, p. 43-50, 1978.

DIMITROV, I.; VALCHEV, I.; VALCHEVA, E. Topochemical kinetics of xylanase action on kraft pulp. **Biocatalysis and Biotransformation**, London, v. 23, n. 1, p. 33-36, Jan./Feb. 2005.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C.C. Beta-xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 32, n. 3, p. 262-268, Dec. 1989.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

DUTTA, T.; SENGUPTA, R.; SAHOO, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citricum*: production, purification and characterization. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 206-211, Feb. 2007.

ELEGIR, G.; SZAKACS, M.; JEFFRIES, T.W. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. strain B-12-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2609-2615, July 1994.

ELEGIR, G.; SYKES, M.; JEFFRIES, T.W. Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 10, p. 954-959, Oct. 1995.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. **A cultura da banana**. Brasília: Embrapa-Spi, 1994. 81p.

FAOSTAT. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=CBD.CropsAndProducts&Domain=CBD&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EM>>. Acesso em: 2 jun. 2006b.

FAOSTAT. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/faostat/servlet/XteServlet3?Areas=%3E872&Items=486&Elements=51&Years=2005&Format=Table&Xaxis=Years&Yaxis=Countries&Aggregate=&Calculate=&Domain=SUA&ItemTypes=Production.Crops.Primary&language=EM>>. Acesso em: 10 jun. 2006a.

FERREIRA FILHO, E.X. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 5, p. 1093-1109, May 1994.

FERREIRA, M.H. **Atividade xilanolítica de *Penicillium griseoroseum* cultivado em resíduo lignocelulósico**. 1998. 52p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

FIGUEIREDO, P.S. **A sociedade do lixo: os resíduos, a questão energética e a crise ambiental**. Piracicaba: UNIMEP, 1995. p. 47-56.

FLORES, M.E.; PEREA, M.; RODRÍGUEZ, O.; MALVÁEZ, A.; HUITRÓN, C. Physiological studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-3, p. 179-187, Aug. 1996.

GARAVELLO, M.E.P.E. (Coord.) **A palha e o fio da bananeira: manual de produção**. Piracicaba: ESALQ-USP-SCTDE, 1999. 34p.

GARG, A.P.; ROBERTS, J.C.; McCARTHY, A.J. Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 7, p. 594-598, May 1998.

GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. Preparation, characterization and application of *Aspergillus* sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 165-175, Dec. 1998.

_____. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 511-519, Mar 1999.

GERARD, C. Purification of glycoproteins. In: ABELSON, J.N.; SIMON, M.I (Ed.). **Methods in enzymology: guide to protein purification**. London: Academic Press, 1990. v. 182, section 9, chap. 40, p. 529-539.

HAAS, H.; HERFURTH, E.; STOFFLER, G. REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1117, n. 3, p. 279-286, Oct. 1992.

HORTON, G.L.; RIVERS, D.B.; EMERT, G.H. Preparation of celluloses for enzymatic conversion. **Industrial and Engineering Chemistry. Product Research and Development**, Washington, v. 19, n. 3, p. 422-429, Sept. 1980.

INSTITUTO DE TERRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (ITESP). **Fatos da Terra**. v.1, n.3, p.11-15, set./out. 2000.

JARMAN, C.G.; MYKOLUK, S.; KENNEDY, L.; CANNING, A.J. Banana fibre: a review of its properties and small-scale extraction and processing. **Tropical Science**, London, v. 19, n. 4, p. 173-185, 1977.

JIANG, Z.Q.; LI, X.T.; YANG, S.Q.; LI, L.T.; LI, Y.; FENG, W.Y. Biobleach boosting effect of recombinant xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on wheat straw pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, n. 1, p. 65-71, Mar. 2006.

KANG, S.W., PARK, Y.S., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, p. 153-156, Jan. 2004.

KANSOH, A.L.; NAGIEB, Z.A. Xylanase and Mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 85, n. 2, p. 103-114, Feb. 2004.

KENEALY, W.R.; JEFFRIES, T.W. Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments. In: GOODELL, B.; NICHOLA, D.D.; SCHULTZ, T.P. (Ed.). **Wood deterioration and preservation**: advances in our changin world. San Diego: American Chemical Society, 2003. chap. 12, p. 210-239 (ACS symposium series 845).

KULKARNI, N.; RAO, M. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 167-173, Nov. 1996.

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

LADISCH, M.R. Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, London, v. 14, n. 1, p. 21-25, 1979.

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

LEITES, A.S.; PELISSARI, F.A.; MOLINA, S.M.G. Degomagem enzimática de fibras têxteis de Musáceas. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 316, 2000. Supplement. Program and Abstract 46nd. National Congress of Genetic, 2000 apresentado em Águas de Lindóia.

LINEWEAVER; H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 56, n. 3, p. 658-666, Mar. 1934.

MATTHIESEN, M.L; BOTEON, M. **Análise dos principais pólos produtores de banana no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/banana.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2006.

MEDEIROS, R.G.; SILVA JÚNIOR, F.G.; BÁO, S.N.; HANADA, R.; FERREIRA FILHO, E.X. Application of xylanases from Amazon Forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil, v. 50, n. 2, p. 231-238, Mar. 2007.

MEDEIROS, R.G.; SOFFNER, M.L.A.P.; THOMÉ, J.A.; CACAIS, A.O.G.; ESTELLES, R.S.; SALLES, B.C.; FERREIRA, H.M.; LUCENA NETO, S.A.; SILVA JR, F.G.; FILHO, E.X.F. The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate. **Biotechnology Progress**, New York, v. 16, n. 3 p. 522-524, June 2000.

MEDINA, J.C. **Banana**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1961. 61p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar.1959.

MOLINA, S.M.G.; PELISSARI, F.A.; VITORELLO, C.B.M. Screening of pectnolytic fungi for degumming of textile fiber and its genetic improvment. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 320-326, Oct./Dec. 2001.

MONTI, R.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and properties of na extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 9, p. 675-681, Sept. 1991.

NINAWA, S.; KUHAD, R.C. Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoaldalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 18, p. 2291-2295, Dec. 2006.

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**, Essex, v. 97, n. 6, p. 862-867, Apr. 2006.

PAICE. M.G.; GUMAGUL, N.; PAGE. D.H.; JURASEK, L. Mechanism of hemicellulose-direct prebleaching of kraft pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 4, p. 272-276, Apr. 1992.

PALLU, A.P.S.; MOLINA, S.M.G. Otimização da atividade de xilanases em linhagens mutantes de *Penicillium chrysogenum*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 11., 2003, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: Agropecuária, 2003. p. 76.

PALLU, A.P.S.; ERLO, L. F.; MOLINA, S.M.G. Melhoramento genético e seleção de mutantes xilanolíticos de *Penicillium chrysogenum*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 10., 2002, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: Agropecuária, 2002.

_____ Produção de xilanases por *Penicillium chrysogenum* em resíduos de bananeiras frutíferas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 9., 2001, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: Agropecuária, 2001. p. 204.

PATEL, R.N.; GRABSKI, A.C.; JEFFRIES, T.W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseisrleroticus* xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, n. 3, p.405-412, June 1993.

PINHEIRO, V.D. **Produção e caracterização parcial de xilanases de *Penicillium expansum***. 1999. 65p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MCDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141-148, 1953.

PRADE, R. Xylanases: from biology and biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle Upon Tyne, v. 13, p. 101-131, 1995.

PULS, J.; POUTANEN, K. Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicellulose (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: COUGHLAN, M. P. (Ed.). **Enzyme systems for lignocellulose degradation**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p.151-165.

QUERIDO, A.L.S.; COELHO, J.L.C.; ARAÚJO, E.F.; CHAVES-ALVES, V.M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brazil, v. 49, p. 475-480, May 2006.

RANI, D.S.; NAND, K. Purification and characterisation of xylanolytic enzymes of a cellulase-free thermophilic strain of *Clostridium absonum* CFR-702. **Anaerobe**, v. 7, p. 45-53, Feb. 2001.

REESE, E.T.; MAGUIRE, A.; PARRISH, F.W. Production of β -xylopyranosidases by fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 19, n. 9, p. 1065-1074, Sept.1973.

REILLY, P.J. Xylanases: structure and function. **Basic Life Science**, New York, v. 18, p. 111-129, 1981.

REYS, J.; PERALTA-ZANORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas: efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 140-143, mar./abr.1998.

ROCHELLE, L.A.; RODRIGUES, R.R.; CAPELLARI JUNIOR, L. **Famílias de plantas fanerogâmicas de interesse econômico**. Piracicaba: CALQ, 1991. 57p.

RONCERO, M.B.; TORRES, A.L.; COLOM, J.F.; VIDAL, C.T. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of *Eucalyptus* pulp. **Process Biochemistry**, London, v. 36, n. 1-2, p. 45-50, Sept. 2000.

SAHA, B.C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 11, p. 1279–1284, June 2002.

SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; BÁO, S.N.; SILVA JÚNIOR, F.G.; FERREIRA FILHO, E.X. Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humilola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 343-349, Jan. 2005.

SANDRIM, V.C.; RIZZATTI, A.C.S.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; MILAGRES, A.M.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 5, p. 1823–1828, Apr. 2005.

- SCOPES, R.K. **Protein purification**: principles and practice. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.
- SHAH, A.K.; SIDID, S.S.; AHMAD, A.; RELE, M.V. Treatment of bagasse pulp with cellulase-free xylanases from an alkalophilic *Bacillus* sp. Sam-3. **Bioresource Technology**, Essex, v. 68, n. 2, p. 133-140, May 1999.
- SHATALOV, A.A.; PEREIRA, H. Xylanase pre-treatment of giant reed organosolv pulps: Direct bleaching effect and bleach boosting. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 3, p. 248-256, Apr. 2007.
- SHATALOV, A.A.; QUILHÓ, T., PEREIRA, H. *Arundo donax* L. reed: new perspectives for pulping and bleaching. 1. Raw material characterization. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 84, n. 1, p. 1-12, Jan. 2001.
- SILVA, A.G. **Utilização do pseudocaule da bananeira para produção de celulose e papel**. 1998. 90p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- SILVA, L.A.O. **Produção, purificação e caracterização das xilanases de *Trichoderma inhamatum***. 2006. 94p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- SILVA JUNIOR, J.G. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125p.
- SILVEIRA, F.Q.P.; SOUSA, M.V.; RICART, C.A.O.; MILAGRES, A.M.F.; MEDEIROS, C.L.; FERREIRA FILHO, E.X. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 23, n. 1, p. 682-685, July 1999.
- SINITSYNA, O.A.; BUKHTOYAROW, F.E.; GUSAKOW, A.V.; OKUNEV, O.V.; BEKKAREVITCH, A.O.; VINETSKY, YU. P.; SINITSYN, A.P. Isolation and Properties of Major Components of *Penicillium canescens* Extracellular Enzyme Complex. **Biochemistry**, Moscow, v.68, n.11, p.1200-1209, Nov. 2003.

SOFFNER, M.L.A.P. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira.** 2001. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SRIPRANG, R.; ASANO, K.; GOBSUK, J.; TANAPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Improvement of thermostability of fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 454-462, Dec. 2006.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SZENDEFY, J.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 6, p. 1354-1360, Oct. 2006.

TSAO, G.T. Conversion of cellulosics: Structures of cellulosic material and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D.I.; MOO-YOUNG, M. (Eds). **Perspectives in biotechnology and applied microbiology**. New York: Elsevier, 1986. p. 205-212.

VIIKARI, L.; PAUNA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 3., 1986, Stockholm. **Proceedings...**Stockholm: Sweden, 1986, p. 67-69.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Aminoácidos. In: _____. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 4, p. 77-92.

_____ Proteínas: Estrutura Primária. In: _____. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 5, p. 93-124.

WANG, S.L., YEN, Y.H., SHIH, I.L., CHANG, A.C., CHANG, W.T. et al. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 7, p. 917-925, Dec. 2003.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal and Microbiology**, Ottawa, v. 32, n. 7, p. 570-576, July 1986.

_____. Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 52, n. 3, p. 305-317, Sept. 1988.

XIMENES, F.A.; SOUZA, M.V.; PULS, J.; SILVA JÚNIOR, F.G.; FERREIRA FILHO, E.X. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, New York, v. 38, n. 1, p. 18-21, Jan. 1999.

ZANOELO, F. F. **Caracterização bioquímica das enzimas do complexo xilanolítico de *Scytalidium thermophilum***. 2001. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

ZHAO, J.; LI, X.; QU, Y. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 13, p. 1470-1476, Sept. 2006.