



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E**  
**CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**XILANASE PRODUZIDA POR *Penicillium roqueforti* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL**

**ITAPETINGA-BA**  
**BAHIA- BRASIL**  
**MARÇO DE 2017**

**LUCAS OLIVEIRA SOUZA**

**XILANASE PRODUZIDA POR *Penicillium roqueforti* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Franco

**Corientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

**ITAPETINGA-BA  
BAHIA- BRASIL  
MARÇO DE 2017**

633.61 Souza, Lucas Oliveira  
S716x Xilanase produzida por *Penicillium roqueforti* em fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar: produção, caracterização e purificação parcial. / Lucas Oliveira Souza. - Itapetinga: UESB, 2017.  
85p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e co-orientação da Profª. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Bagaço de cana-de-açúcar - Reutilização. 2. *Penicillium roqueforti* - Biotransformação. 3. Enzimas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Título.

CDD(21): **633.61**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Bagaço de cana-de-açúcar - Reutilização
2. *Penicillium roqueforti* - Biotransformação
3. Enzimas



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** XINALASE PRODUZIDA POR *PENICILLIUM roqueforti* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL.

**Autor (a):** LUCAS OLIVEIRA SOUZA

**Orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcelo Franco

**Coorientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo (Coorientadora, UESB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Gomes da Silva (UESB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo (UFLA)

**Itapetinga-BA, 20 de fevereiro de 2017.**

**LUCAS OLIVEIRA SOUZA**

*À minha família que fez tudo para que o meu  
sonho se realizasse, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por guiar-me nos caminhos certos, além da sabedoria concedida para lidar com os problemas e dificuldades que a vida nos impõe.

À minha família, em especial aos meus pais, LUCINEIDE OLIVEIRA SOUZA e FERNANDO SOUZA DE JESUS que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me aconselharam nos momentos de dúvidas.

Aos meus irmãos, Thiago Oliveira, Daniel Oliveira e Talita Silva, pela motivação e torcida. A Iasmin pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

O meu orientador Dr Marcelo Franco, pelo apoio, orientação, respeito, amizade, mas, acima de tudo, por acreditar em mim, e por ter influenciado no meu crescimento pessoal e profissional, me dando total liberdade nas decisões.

As professoras Dra. Elizama e Dr. Julieta pela disponibilidade e ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

A amizade criada durante essa jornada, especialmente aos colegas do LABIOCAT, José Lucas, Taty, Nadab, Ayla, Polyana, Fran, Edvan, Mayara, George, Gleydisom, Natali.

Aos meus colegas “irmão” Adejanildo e Xandy, que mesmo longe estão sempre disposto a me ajudar.

Aos “parceiros” Erivelton, Erick, Clissiane e Analu pela grande amizade.

Á todos que de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SOUZA, L. O. XILANASE PRODUZIDA POR *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL Itapetinga – BA: UESB, 2017. 85p.. Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos.

## RESUMO

A fermentação de resíduos lignocelulósicos por microrganismos vem crescendo ao passar dos anos, devidos as várias biomoléculas de interesse produzidas no processo fermentativo. Dentre essas biomoléculas, destacam-se as xilanases (EC 3.2.1.8), que são enzimas hidrolíticas com a capacidade de clivar as ligações glicosídicas da cadeia principal e das cadeias laterais do polissacarídeo xilana presente na parede celular dos vegetais. As xilanases são constantemente empregadas em processos de clarificação de bebidas, branqueamento da polpa do papel, reciclagem de resíduos agrícolas e produção de biocombustível. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização do bagaço da cana-de-açúcar como substrato para a produção de xilanases por meio da fermentação em estado sólido (FES) empregando *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. Foram avaliadas as melhores condições para a produção de um extrato enzimático bruto com atividade de xilanases por meio de um planejamento experimental do tipo Box-Behnken (PBB) em que os fatores analisados foram a umidade (UD, %), a temperatura (T, °C) e o tempo de fermentação (t, h). O modelo obtido para a atividade de xilanase (XIL, UI/g) foi validado com a repetição das condições ótimas teóricas (UD = 64%, T = 23°C e t = 93 h) que resultaram num valor de XIL = 20,65 UI/g, o que equivale a um desvio de 3,5% do valor predito e uma produtividade de 19,95 UI/g. A comparação das análise físico-química do bagaço in natura e fermentado demonstraram a afinidade do *P. roqueforti* ATCC 10110 na degradação do micronutrientes presente no bagaço da cana, sendo encontrado uma queda de aproximadamente 50% dos nutrientes após a fermentação, e por meio do micrografia eletrônica verificou-se a ação do fungo sobre o substrato. O extrato enzimático bruto contendo as xilanases foi caracterizado, sendo verificado a alta estabilidade desde a exposição ao pH na faixa de 3,0–6,0, e baixa estabilidade no pH 7,0 e pH 8,0, obtendo zero de atividade após 4 horas de análise. Em relação a termoestabilidade, o extrato manteve-se estáveis em diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80 °C) com atividade relativa superior a 50%. Em comparação à xilanase comercial (Sigma®), as xilanases de *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentaram um comportamento semelhante sobre as mesma condições de análise, sendo que em determinados momentos apresentaram melhor desempenho. Para a estabilidade ao congelamento a -20 °C as xilanases não sofreram desativação considerável. O valor de  $K_m$  usando a xilana *beechwood* como substrato, foi de 84,14 mg/mL para as xilanases presente no extrato enzimático bruto; e  $K_m$  de 6,52 mg/mL para a xilanase comercial (Sigma®), cujo o valor de  $V_{máx}$  foi 188,67  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . para o extrato e 114,95  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . para a xilanase comercial (Sigma®), verificou-se a afinidade da enzima pelo substrato xilana. Verificou-se que, a presença  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  no extrato enzimático apresentou um efeito inibidor nas xilanases, enquanto que os íons de  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}_2^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  resultaram na ativação da enzima.

A melhor condição experimental para a purificação por precipitação foi utilizando 100 (m/v) de sulfato de amônia, sendo obtido uma atividade xilanolitica de 40,50 U/m. Portanto, conclui-se que o processo de produção das xilanases ocorreu de forma satisfatória, tendo em vista que o fungo sintetizou e excretou as xilanases sem a necessidade de qualquer outro indutor além do bagaço de cana-de-açúcar.

**Palavra-chave:** reutilização, biotransformação, enzimas.

## ABSTRACT

The fermentation of lignocellulosic residues by microorganisms has been increasing over the years due to several substances of interest produced in the fermentation process. Among the substances, we highlight the xylanases (EC 3.2.1.8), which are hydrolytic enzymes with a cleavage capacity such as the glyceria of the main chain and the side chains of the polysaccharide xylan present in the cell wall of the plants. For an industry, such as xylanases are constantly employed in the processes of bleaching beverages, paper pulp bleaching, recycling of agricultural waste and biofuel production. As well as the objective of the work to evaluate the use of sugarcane wood as a substrate for a xylanase production by means of solid state fermentation (FES) using *Penicillium roqueforti*. They were evaluated as best conditions for a production of crude enzymatic extracts with xylanase activity by means of an experimental design of Box-Behnken (PBB) type in which the analyzed weights were one unit (UD,%), temperature (T, ° C) and the fermentation time (t, h). (UD = 64%, T = 23 ° C and = 93 h) which resulted in a value of XIL = 20.65 The model obtained for a xylanase activity (XIL, UI / g) was validated with a repetition of the theoretical optimum conditions U / g, which corresponds to a deviation of 3.5% of theoretical value and a productivity of 19.95 U / gh. The description of the physical-chemical analysis of the bagasse and the fermentation demonstrated in the tuning of *P. roqueforti* in the degradation of the micronutrients present in the sugarcane bagasse, of about 50% of the nutrients after the fermentation and analysis of electron microscopy Scanning demonstrated a fungus action On the substrate. The crude enzymatic extract containing xylanase was characterized, with high stability being observed the exposure to pH in the range of 3.0 - 6.0, however, it presents low stability not pH 7 and pH 8, obtaining zero activity after 4h Analysis While Which were stable at different temperatures (50, 60, 70 and 80°C) with relative activity higher than 50%. In commercial xylanase (Sigma), a *P. roqueforti* xylanase showed a behavior over the same conduct of analysis, and at certain moments presented better performance. For stability to freezing at -20 ° C as xylanases did not undergo considerable deactivation. The value of Km using a xylan wood as substrate was 84.14 mg / mL for xylanases present in the crude enzyme extract; E Km of 6.52 mg / mL for a commercial xylanase (Sigma®), whose Vmax value was 188.67 µmol / mL.Min. For the extract and 114.95 µmol / mL.Min. For commercial xylanase (Sigma ®), as well as an affinity and enzyme demonstrated on the xylan substrate. The effect of metal ions and salts on the activity of xylanases, showed that the presence of these compounds did not have an inhibitory effect: Mg + 2 and Mn + 2, and activator: Pb + 2, Ca +2, Na2 + 2, Co + 2, Cu + 2 and Zn + 2. For partial purification by precipitation, or a little more than 80% (w / v) ammonium sulfate, with a xylanolytic activity of 8.09 U / mg. Thus, it is concluded that the xylanase production process occurred satisfactorily in view that the fungus synthesized and excreted as xylanases without a need for any other inducer other than sugarcane bagasse

**Keyword:** Reuse, Biotransformation, Enzymes.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xi
CAPÍTULO 1.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Resíduos agroindustriais.....	19
3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	20
3.2 Composição da parede celular.....	22
3.3 Hemicelulose.....	22
3.3.1 Degradação Enzimática da Hemicelulose.....	23
3.4 Fermentação em estado sólido.....	23
3.5 Microrganismos empregados nas FES.....	25
3.5.1 Fungo <i>Penicillium roqueforti</i> .....	26
3.6 Xilana.....	28
3.6.1 Enzimas xilanolíticas.....	29
3.7 Classificação enzimática.....	31
3.8 Sistema xilanolítico.....	31
3.9 Fatores gerais que afetam a produção de xilanase.....	32
3.10 Aplicação industrial da xilanase.....	32
4 REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2 - Otimização de Xilanase por <i>Penicillium Roqueforti</i> produzida por meio da fermentação em estado sólido a partir do bagaço da cana-de-açúcar.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Resíduo de cana-de-açúcar.....	45
2.2 Condições de cultivo do microrganismo.....	45
2.3 Caracterização do resíduo.....	45
2.4 Análise de microscopia de varredura do bagaço da cana-de-açúcar.....	45
2.5 Fermentações em estado sólido (FES).....	46
2.6 Preparo do extrato enzimático bruto.....	46
2.7 Otimização da produção de xilanase.....	47
2.8 Determinação da atividade de xilanase.....	47
2.9 Curva de xilose.....	48
3 RESULTADO E DISCURSÃO.....	49

3.1	Otimização na produção de xilanase.....	49
3.1.1	Composição físico-química do resíduo da cana .....	54
3.2	Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar in natura e fermentada por <i>P. roqueforti</i> .....	55
4	CONCLUSÃO.....	58
CAPÍTULO 3 - Xilanase produzido por <i>Penicillium roqueforti</i> por meio da fermentação em estado sólido a partir do bagaço da cana-de-açúcar: caracterização e purificação parcial. ....		59
RESUMO .....		59
ABSTRACT .....		60
1	INTRODUÇÃO.....	61
2	MATERIAL E MÉTODO .....	61
2.1	Fermentação em Estado Sólido (FES) .....	61
2.1.1	Diferentes fontes de suplementação do resíduo .....	62
2.2	Obtenção do extrato enzimático bruto .....	62
2.2.1	Extração com diferentes tipos de tampões .....	62
2.2.2	Determinação da temperatura ótima de reação.....	63
2.2.3	Determinação da estabilidade térmica.....	63
2.2.4	Determinação do pH ótimo .....	63
2.2.5	Determinação da estabilidade em diferentes valores de pH.....	64
2.2.6	Estabilidade da biomassa ao congelamento.....	64
2.2.7	Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto .....	64
2.2.8	Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{máx}$ ) .....	64
2.2.9	Concentração por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ .....	65
2.2.10	Efeito da adição de diferentes compostos.....	65
2.3	Determinação da atividade de xilanase.....	65
2.3.1	Determinação da proteína total.....	66
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	66
3.1	Caracterização do extrato enzimático bruto.....	66
3.1.1	Efeito de diferentes fontes de suplementação .....	66
3.1.2	Efeito de diferentes tampões de extração .....	68
3.1.3	Efeito da temperatura.....	69
3.1.4	Estabilidade térmica .....	70
3.1.5	Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{máx}$ .....	72
3.1.6	Estabilidade da biomassa ao congelamento.....	74
3.1.7	Estabilidade do extrato bruto ao congelamento.....	74
3.1.8	Efeitos de íons metálico sobre as xilanases .....	75
3.1.9	Estabilidade a diferentes valores de pH.....	77
3.1.10	pH ótimo de reação.....	79

	3.1.11	Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônia.....	81
4		CONCLUSÃO.....	82
5		REFERÊNCIAS .....	83

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1-</b> Cana de açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L). .....	20
<b>Figura 2 -</b> Bagaço da cana (a); Bagaço da cana triturada (2 mm) (b). .....	21
<b>Figura 3-</b> Composição da parede celular vegetal .....	22
<b>Figura 4-</b> Fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar. ....	24
<b>Figura 5-</b> Hifas penetrativas e áreas. ....	26
<b>Figura 6-</b> Morfologia do conidióforo de <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 (a); <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em meio BDA (b). ....	27
<b>Figura 7 -</b> Composição da O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (xilana de madeira dura) ..	28
<b>Figura 8 -</b> (a): Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. (b): Hidrólise de xilo-oligossacarídeo pela $\beta$ -xilosidase .....	30

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1-</b> Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis umidade (U), temperatura ( $^{\circ}$ C) e tempo de fermentação (T) utilizada na produção de xilanase .....	50
<b>Figura 2-</b> Superfícies de resposta – (a), (c) e (e) – e curvas de contorno – (b), (d) e (f) – para as variáveis independentes: tempo (t, h), temperatura (T, $^{\circ}$ C) e umidade (UD, %) e a variável dependente: atividade de xilanase (XIL, UI/g) obtida do cultivo de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 em bagaço de cana-de-açúcar. ....	53
<b>Figura 3</b> –Micrografias do: (a, (b) e (c) - Bagaço da cana-de-açúcar in natura (100x -300 e 1000x); d) e) e f) -Bagaço fermentado por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 (100-300 e 1000x). São destacadas a ação do fungo sobre o resíduo. ....	56
<b>Figura 4-</b> Micrografias por MEV a 3000x de uma partícula do bagaço da cana-de-açúcar fermentada por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110, destacando a ação do fungo sobre o resíduo .	57

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1-</b> Atividades relativas de diferentes fontes de suplementação na produção das xilanases por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana em FES. ....	67
<b>Figura 2</b> – Atividades relativas para diferentes tampões empregados na extração de xilanases produzidas por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. ....	68

<b>Figura 3-</b> Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase presente no extrato enzimático bruto de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana. ....	69
<b>Figura 4 -</b> (a)Termoestabilidade da xilanase (em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8) de <i>P. roqueforti</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas. As atividades foram expressas como atividades relativas em comparação com a condição de partida contendo 19,95U/g e b) em relação à atividade relativa apresentada por uma xilanase comercial (Sigma®) com atividade inicial de 109,92 UI/g. ....	71
<b>Figura 5–</b> Linearização de Linewaver-Burke para os dados cinéticos do extrato bruto contendo atividade de xilanase de <i>P. roqueforti</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. O substrato cinético foi xilana e a reação foi conduzida em tampão citrato de sódio (0,0 5 mol/L, pH 4,8) a 50°C a 10 min. ....	73
<b>Figura 6-</b> Atividades relativas da estabilidade da biomassa fermentada de cana-de-açúcar de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 ao longo do tempo congelamento (-20°C). ....	74
<b>Figura 7-</b> Atividades relativas da estabilidade do extrato bruto de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 ao longo do tempo de estoque sob congelamento (-20°C). ....	75
<b>Figura 8-</b> Efeito da adição de íons, a 2 mmol/l, sobre a atividade da xilanase de <i>P. roqueforti</i> cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. A incubação foi conduzida em tampão citrato de sódio (0,05mol/L, pH = 4,8) e 50°C por 10 min. As colunas escuras representam a atividade residual em relação à condição inicial $U_o = 20,97$ UI/g. As colunas claras apresentam a razão entre as atividades relativas da xilanase de <i>P. roqueforti</i> e uma xilanase comercial sob as mesmas condições, na concentração de 1% (p/v) sendo sua condição inicial. ....	76
<b>Figura 9-</b> (a) Barras representam a termoestabilidade da xilanase de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas. As atividades foram expressas como atividades relativas, (b)representam a relação à atividade relativa apresentada por uma xilanase comercial (Sigma®) com atividade inicial 109.92 UI/g. ....	78
<b>Figura 10-</b> pH ótimo das xilanases presenta no extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido por <i>P. roqueforti</i> . As colunas escuras apresentam a atividade em relação a sua condição inicial de 20,97 UI/g e o gráfico de linha apresentam a atividade relativa em relação à atividade relativa de uma xilanase comercial (Sigma®) sob as mas condições e atividade inicial de 156,33 UI/g. ....	80
<b>Figura 11-</b> Atividade relativa da xilanase precipitada após a saturação com sulfato de amônia. Com a condição inicial de $U_o = 17,66$ U/mg. ....	81

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> - Níveis e variáveis estudadas no delineamento Box–Behnken para avaliação da melhor produção da xilanase. ....	47
<b>Tabela 2</b> - Volume de soluções utilizadas para construção de curva analítica de calibração de xilose.....	48
<b>Tabela 3</b> – Matriz de Box-Behnken para as variáveis independentes: tempo (t, h), temperatura (T, °C) e umidade (UD, %) e a variável dependente; atividade de xilanase (XIL, UI/g) obtida no extrato enzimático proveniente do cultivo de <i>P. roqueforti</i> em 5 g de bagaço de cana-de-açúcar. ....	49
<b>Tabela 4</b> -Resultados da análise de regressão para a atividade de xilanases no planejamento experimental Box–Behnken. ....	51
<b>Tabela 5</b> – Condições experimentais para os fatores: tempo (t), umidade (UD) e temperatura (T) para a validação do modelo matemático obtido do planejamento Box-Behnken para resposta: atividade de xilanase (XIL). ....	51
<b>Tabela 6</b> - Composição físico-química (% , g/100g de resíduo) do resíduo da cana in natura e após a fermentação em estado sólido por <i>P. roqueforti</i> no tempo ótimo estabelecido pelo modelo estatístico. ....	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FES	Fermentação em Estado Sólido
FSM	Fermentação Submersa
PBB	Box-Behnken
P <sub>c</sub>	Ponto Crítico
MSR	Metodologia da superfície de resposta
FDN	Fibra em detergente neutro
FDA	Fibra em detergente ácido
LIG	Lignina
CE	Celulose
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
PDA	Potato dextrose Agar
HM	Hemicelulose
BSA	Albumina do Soro Bovino
ANOVA	Análise de Variância
GL	Graus de Liberdade
SQ	Somas dos Quadrados
QM	Quadrado Médio
P	Probabilidade
MS	Matéria seca
PTN	Proteína
MEV	Micrografia
UI/g	Unidade internacional por grama
pI	Ponto isoelétrico
kDa	Quilodaltons

# CAPÍTULO 1

---

*INTRODUÇÃO*

*OBJETIVOS*

*REFERENCIAL TEÓRICO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos lignocelulósicos são produzidos em grande quantidade pelas indústrias de processamento de alimentos, e a maioria é eliminada por incineração para fornecimento de energia na própria indústria. No entanto, esses resíduos apresentam micronutrientes que podem ser reutilizados em processo de biotransformação por fermentação, no intuito de serem convertidos a diferentes produtos de alto valor agregado como biocombustíveis, produtos químicos, enzimas, entre outros (ANWAR et al., 2014; WANG et al., 2012).

Segundo Sanchez (2009) esses resíduos são composto de moléculas complexas e resistentes, os quais são destacados os polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que são unidos entre si por meio de ligações covalentes. Dentre os diferentes resíduos lignocelulósicos o bagaço da cana é obtido após o processo de esmagamento e extração do caldo, e no Brasil são gerados em média 195 milhões de toneladas deste resíduo por ano, no Brasil (GOTTSCALK et al., 2010), e isso vem despertando o interesse da sua aplicação como matéria prima para processos fermentativos e obtenção de metabólitos secundários.

Dentre os metabólitos secundários produzidos durante o processo de fermentação, as enzimas são interessantes para a indústria devido à aplicação nos mais diversos setores, como nas indústrias de alimentos, papel, têxtil, animal e farmacêutica. As vantagens do uso de enzimas estão relacionadas ao alto grau de especificidade de suas reações, o que contribui com a eficiência do processo, além de atuarem em condições neutras de pH e brandas temperaturas (BEG et al., 2001).

As enzimas xilanolíticas são normalmente secretadas por fungos e, como enzimas hidrolíticas, tem a capacidade de clivar as ligações glicosídicas da xilana, a qual é o principal componente da hemicelulose vegetal, sendo por isso muito aplicadas nas etapas de branqueamento de polpas de celulose reduzindo a utilização de produtos altamente poluentes. Além disso, podem atuar no processo de engorda de animais, devido as enzimas aturem sobre a parede celular vegetal, tornado os nutrientes mais exposto e facilmente absorvidos pelos animais, clarificação de sucos e vinhos e na liberação de xilo-oligossacarídeos que podem ser então convertidos em outros produtos de interesse (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; HUANG et al., 2014).

A produção de xilanases pelos fungos filamentosos pode ser realizada por processos fermentativos, destacando-se a fermentação em estado sólido (FES) que permite empregar diferentes resíduos lignocelulósicos como fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a produção, caracterização e purificação parcial de xilanases produzido por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por meio da fermentação em estado sólido do bagaço da cana-de-açúcar.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar a produção de xilanases por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato na fermentação em estado sólido para a produção de enzimas xilanolíticas;
- Caracterizar físico-quimicamente o bagaço da cana-de-açúcar após a fermentação com o *P. roqueforti* ATCC 10110;
- Caracterizar o extrato multienzimático bruto quanto a sua atividade xilanolítica,
- Purificar parcialmente as xilanases produzidas pela fermentação em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Resíduos agroindustriais

A maior parcela de contribuição para a economia brasileira é por meio da produção e exportação de produtos agrícolas (café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros). Entretanto, são gerado pelas indústrias de processamento de alimentos grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, em alguns casos são descartados inadequadamente, pois o acúmulo contínuo deste resíduos em “aterros” podem ocasionar, em curto prazo, sérios problemas, como por exemplo a proliferação de pragas (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Mas, segundo Forster et al. (2013), a situação ainda é mais delicada em virtude do Brasil apresentar um fluxo contínuo de produção agrícola, induzindo a instalação de novas indústrias de processamento, antes mesmo de contornar a excessiva geração de resíduos lignocelulósicos. De acordo Virmond et al. (2013), os resíduos agroindustriais produzidos no Brasil ultrapassam 324.788 toneladas. De acordo a FAO (2012) a perda de alimentos devido aos resíduos gerados é em entorno de 30% para os cereais, 40-50% para culturas de raízes, frutas e legumes, 20% para as sementes oleaginosas, carne e produtos lácteos e mais de 35% para os peixes, chegando a 2,3 bilhões de toneladas em 2009/2010).

A preocupação é ainda maior entre os países que não conseguem reaproveitar seus resíduos agroindustriais e agrícolas nem mesmo sob a ótica de agregação de valor ao resíduo, rico em micronutrientes. Estima-se que de 60-70% dos produtos orgânicos advindos de processamentos de alimentos e indústrias de bebidas são descartados sem qualquer tratamento ou fins retornáveis, e apenas 30-40% são reutilizadas em países da África, Europa Oriental, América Latina e Ásia como fonte de energia (INICIATIVE, 2011).

Essa perspectiva de reaproveitamento tem evoluído, ainda que lentamente, a cada ano devido ao aumento da conscientização da necessidade e importância da reutilização dos resíduos orgânicos como fonte energética secundária e renovável para as indústrias. Muitos pesquisadores, como Uenojo e Pastore (2007), defendem a aplicação dos resíduos em processos de biocatálise e/ou biotransformação como prática promissora devido ao seu baixo custo e alto valor energético que permitem, por exemplo, a obtenção de enzimas industriais por processos mais baratos.

Para a produção de um complexo multienzimático ou de uma enzima pura de interesse industrial é necessário a seleção adequada do substrato, assim como a seleção de resíduos rico em hemicelulose, para a produção de xilanase, ou uma fonte rica em celulose,

para produção de celulases (PANDEY, et al., 2000). Estes resíduos, como o bagaço de cana, são potenciais substratos para os mais diversificados processos fermentativos; Biz et al. (2016) por exemplo, produziu pectinases por FES empregando uma mistura de resíduos de cítricos e bagaço de cana, enquanto Leite et al. (2016) que empregou bagaço da azeitona na produção de celulases e xilanases.

### 3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Figura 1), foi introduzida no Brasil durante o período colonial, e tornou-se a principal cultura brasileira, tornando o país o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Segundo a UNICA (2016) o Brasil produz mais de 632 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano (safra 2014/2015), sendo também o maior produtor mundial de açúcar, com 36 milhões de toneladas produzidas e 24 milhões de toneladas exportadas no ciclo 2014/2015 - quantias equivalentes a 20% da produção global e 40% da exportação mundial. No caso do etanol, o país é o segundo maior produtor mundial (ranking liderado pelos Estados Unidos). Na safra 2014/2015, o volume produzido atingiu 28 bilhões de litros.

**Figura 1-** Cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

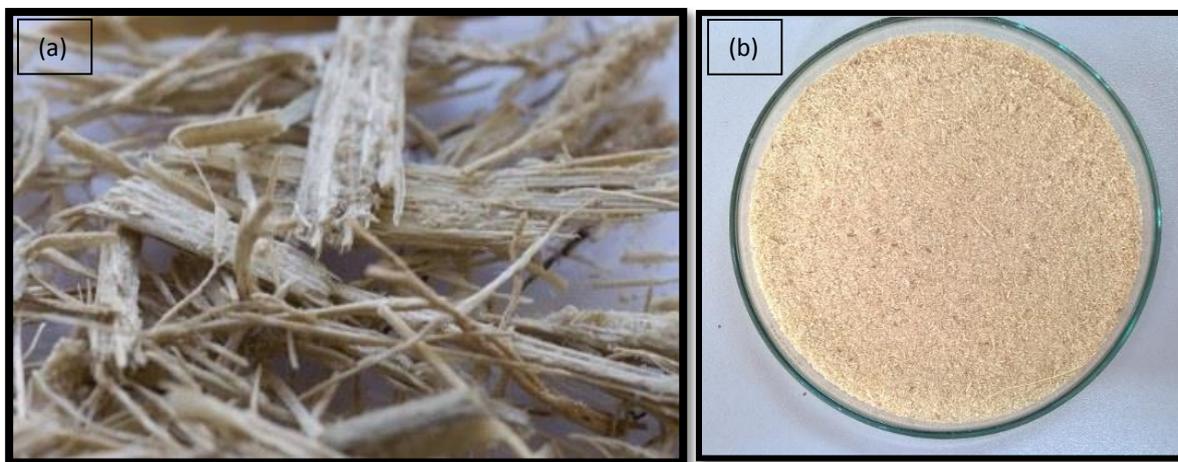


Fonte: <http://www.natureloveyou.sg/Plants-S.html>

A área cultivada com cana-de-açúcar colhida na safra 2014/15 foi de aproximadamente 9.130,1 mil hectares, distribuída em todos estados produtores. No entanto o estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 51,7% (4.696,3 mil) da área plantada, seguido por Goiás com 9,3% (878,27 mil), Minas Gerais com 8,9% (788,88 mil), Mato Grosso do Sul com 7,4% (712,39 mil), Paraná com 6,7% (644,65 mil), Alagoas com 4,7% (390,40 mil hectares) e Pernambuco com 3,2% (277,74 mil hectares). Estes sete estados são responsáveis por 91,9% da produção nacional. Os demais estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 3,0%.

O bagaço de cana (Figura 2), juntamente com a palha são os resíduos remanescentes das indústrias de processamento de açúcares, etanol, cachaça, entre outros. O bagaço de cana-de-açúcar reúne fragmentos grosseiros da parede celular e conteúdo celular não extraído na moagem da cana-de-açúcar, cujo componente principal é representado pelos açúcares não extraídos durante a moagem, correspondendo a aproximadamente 2 a 3% (m/m). O bagaço apresenta ainda de 70 a 85% de carboidratos estruturais, dos quais a celulose é o principal componente (44 a 50%), seguida da hemicelulose (24 a 30%) e da lignina (10 a 20%) (MEDEIROS, 1992).

**Figura 2** - Bagaço da cana (a); Bagaço da cana triturada (2 mm) (b).



Fonte: (a) <http://www.canaonline.com.br/conteudo/biolarvicida-obtido-do-bagaco-da-cana-mata-larvas-de-aedes-aegypti.html>; (b) arquivo pessoal

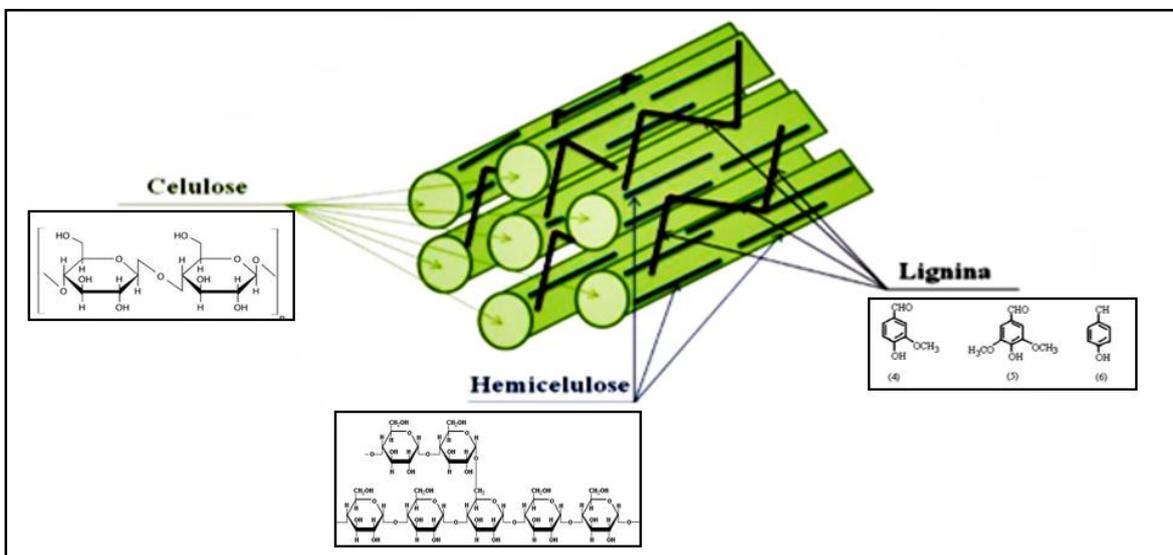
O acúmulo desse resíduo é reflexo direto da crescente demanda por bioetanol e produção de açúcar (WALTER et al., 2011). Para cada tonelada de cana moída ou esmagada na unidade industrial, se obtêm em média 120 kg de açúcar e mais 14 litros de álcool, ou 80 litros de álcool no caso de destilaria, sendo que, para a quantidade de cana esmagada é consequente obtenção de produtos, são obtidos cerca de 100 a 400 kg de torta de filtro, 0,8

a 1 mil litros de vinhaça e 260 kg de bagaço de cana. Estima-se que o bagaço proveniente da agroindústria da cana seja de aproximadamente 280 kg por tonelada de cana moída (30% do total) (GOTTSCHALK, et al.,2010; SILVA et al. (2007),

### 3.2 Composição da parede celular

A parede celular vegetal é formada por uma estrutura de celulose, hemicelulose e ligninas em ligações cruzadas, submersas em uma matriz de substâncias pécticas e reforçadas com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (Figura 3). A parede celular está dividida em níveis estruturais como: parede primária, parede secundária e lamela média.

**Figura 3-** Composição da parede celular vegetal



Fonte: <https://www.emaze.com/@AOOITQIW/-copy1>

A parede primária possui um percentual de aproximadamente 70% de água, os 30% restantes correspondem à matéria seca que está representada em sua maioria por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina). A parede secundária é composta principalmente por celulose apresentando também lignina, enquanto, a lamela média preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes, sendo constituída principalmente de pectina, pectato e hemicelulose (PRADE et al., 1999).

### 3.3 Hemicelulose

As hemiceluloses são polímeros constituídos de vários monossacarídeos, principalmente de D-xilose e por outras subunidades, com D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glicorônico e ácido galacturônico. A hemicelulose está

fortemente ligada à celulose por ligações de hidrogênio e também através de ligações covalentes. A xilana, principal polissacarídeo presente na hemicelulose, é um homopolímero linear formado por monômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (LI et al., 2007).

### **3.3.1 Degradação Enzimática da Hemicelulose**

Devido à grande complexidade e heterogeneidade da rede hemicelulolítica a sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas que atuam cooperativamente. Para isso, a determinação de quais tipos de enzimas são necessárias irá depender da composição da biomassa a ser degradada. Para a degradação de xilanas em geral são necessárias basicamente seis enzimas diferentes (Endo- $\beta$ -xilanasases (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidases,  $\alpha$ -arabinofuranosidase, acetilxilano esterase,  $\alpha$ -D-glucuronidase, ácido ferrúlico esterase) (SAHA, 2003).

Uma das principais enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose são as endo-1,4- $\beta$ - $\delta$ -xilanasases (EC 3.2.1.8) que são enzimas que clivam aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana produzindo, principalmente, oligossacarídeos de xilose. Estas são uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. As  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) por sua vez catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos e xilobiose a partir de terminais não redutores, liberando xilose (SAHA, 2003).

## **3.4 Fermentação em estado sólido**

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como o cultivo e crescimento de microrganismos (fungos e/ou bactérias) sobre um substrato sólido, que pode ser usado como fonte de carbono e energia, com a mínima quantidade de água livre entre as partículas (Figura 4). Os microrganismos presentes ou adicionados no substrato se desenvolvem entre os fragmentos/superfícies, consumindo os micronutrientes presentes no substrato e induzindo a secreção de metabólitos como as enzimas extracelulares, sendo esta uma prática muito comum na obtenção de alimentos fermentados (RAHARDJO, et al., 2005).

**Figura 4-** Fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: arquivo pessoal

O material sólido (resíduo) utilizado em FES é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa o que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado; com substratos celulósicos é possível trabalhar com teores de umidade mais elevados 60 a 80% sem que seja possível detectar visualmente um meio aquoso (SOCCOL, 1992).

Segundo Rodriguez et al. (2006) a FES é um sistema promissor, em função da biotransformação do resíduo em substância alternativa (complexo multienzimático), com uma baixa demanda de água e energia, que atende bem aos apelos ecológicos atuais.

O princípio das FES tem sido utilizado desde a antiguidade, os chineses foram os precursores que integraram a técnica na produção de alimentos, mesmo de forma indireta, como na produção de molho de soja, desde cerca de 3000 a.C. (ARAÚJO, 2004) e quando começaram a enfrentar problemas de limitação de proteína e baixa digestibilidade das matérias-primas. Assim, os benefícios deste tipo de processo fermentativo foram sendo descobertos e hoje as FES apresentam diversas vantagens industriais e são exploradas, além da produção direta de alimentos, em diversos processos como a compostagem, a produção de silagem e o cultivo de cogumelos.

Atualmente, muitos alimentos consumidos pelo mundo são obtidos por FES, com o intuito de atribuir uma característica sensorial específica, como: a produção de queijo pelo

fungo *Penicillium roqueforti*, a fermentação de arroz ou cevada na elaboração de saquê por *Aspergillus oryzae* ou *A. kawachii*, e a produção de missô e shoyu utilizando *A. oryzae*. (Rutz et al., 2008).

São vários os benefícios advindos da realização de FES, como relatado por diversos pesquisadores em comparação com as fermentações submersas (FSM) (BANSA et al., 2012; KUMAR et al., 2013). Estudos de FES tem sido constantemente realizados, como por exemplo, os estudos de Hsu et al. (2012) e Graminha et al. (2008) que avaliaram as proteínas aplicadas em ração animal ou ainda Santos et al. (2013) que estudaram a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger*, obtendo 14,18 UI/mL para CMCases, 7,51 UI/mL para FPases e 11,96 UI/mL para xilanases. Ferraz, et al. (2016) estudaram o perfil da produção de xilanase por *P. roqueforti* através da FES de resíduo de cajá, cuja a máxima produção foi de máxima  $26,33 \pm 0,53$  U/g no tempo de 120 horas de fermentação.

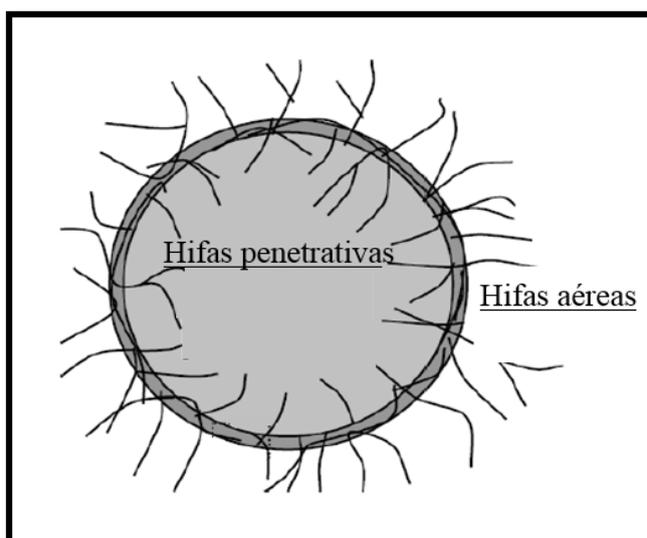
### 3.5 Microrganismos empregados nas FES

Dentre a diversidade de microrganismos constantemente utilizados em processos fermentativos estão os fungos filamentosos, os mais adaptáveis à fermentação sólida, cuja exigência de atividade de água ( $a_w$ ) é baixa (0,6 – 0,8) e são capazes de excretar diferentes metabólitos secundários (proteases, celulasas,  $\alpha$ -amilase, glucose isomerase, xilanase) em função das condições de escassez de micronutrientes oferecidos pelo substrato (PINTO, 2003).

De acordo Pandey (1992), a seleção adequada do microrganismo para um processo fermentativo é um dos mais importantes critérios, pode se dizer que os fungos apresentam elevada eficiência na bioconversão do substrato e permitem sua rápida liberação para o meio. É de interesse biotecnológico que os metabólitos excretados não sejam incompatíveis com o produto de interesse ou apresentem inconstância quanto ao comportamento fisiológico, sejam patogênicos, exijam condições de processo muito complexas ou meios de cultura dispendiosos (SCHMIDELL, 2001).

A maioria dos fungos empregados em FES são caracterizados como multicelulares, filamentosos de aspecto algodinoso e se apresentam em várias cores (branco, verde claro, rosa, cinza escuro, etc.). Quando esses fungos filamentosos são submetidos ao processo fermentativo, são formados dois tipos de hifas (Figura 5), assim denominadas: 1) hifas aéreas; 2) hifas penetrativas.

**Figura 5-** Hifas penetrativas e áreas.



Fonte: Mitechell et al., (2006b).

As hifas aéreas aparecem na superfície (interface ar-líquido), enquanto as hifas penetrativas se encontram diretamente ligadas ao resíduo, sendo essa interação um importante papel no processo de degradação dos micronutrientes, que posteriormente serão consumidos pelo fungo. Portanto, a degradação enzimática do substrato pela fração penetrativa das hifas é um fator determinante para o processo fermentativo, pois, a partir daí, os fragmentos se deslocam até a superfície das partículas, sendo transformados pela ação do fungos em compostos metabolizáveis (SANTANA et al., 2012).

Neste contexto, estes microrganismos apresentam uma habilidade excepcional, o que promove um grande interesse comercial na sua aplicação em biotransformação do resíduos e produção de enzimas (BANSAL et al., 2012; NARRA et al., 2012)

### **3.5.1 Fungo *Penicillium roqueforti***

As muitas variedades de fungos são classificadas de acordo com a sua morfologia e a categoria taxonômica determinada pelo Código Internacional de Botânica (GREUTER et al., 2000). Dentre os diferentes tipos de fungos, são encontrados a grande família *Trichocomaceae*, que engloba diversas espécies de interesse para indústria de alimentos, sendo os mais conhecidos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011).

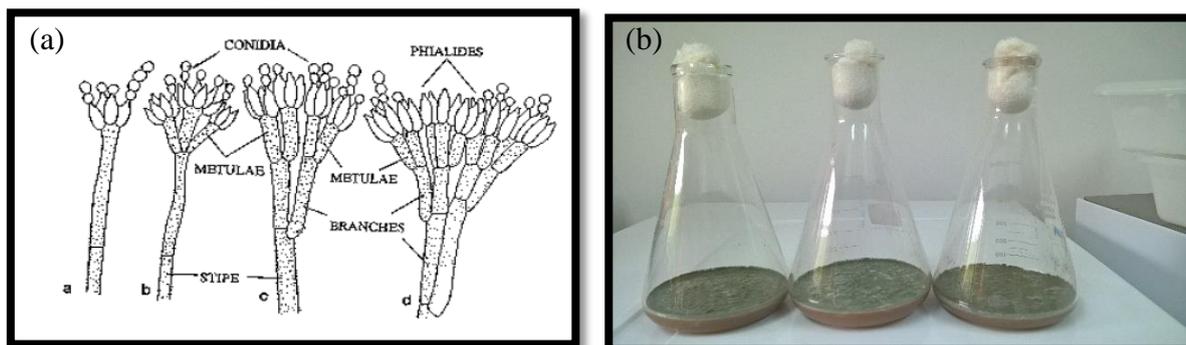
O gênero *Penicillium* é fortemente empregados na indústria de laticínios devido a facilidade de adaptação e resposta aos substratos fornecidos. As espécies pertinentes a esse

gênero tem sido submetidas a diversos estudos básicos, e muitos pesquisadores tem observados um grande potencial biotecnológico decorrente dos metabólitos produzidos por estes fungos e que podem ser destinados a diferentes ramos industriais (PALLU, 2010).

Dentre as várias espécies de *Penicillium*, existem variedades produtoras de microtoxinas (*Penicillium citrionigrum* e *Penicillium islandicum*), mas muitas outras espécies desse gênero não são patogênicas, e são o foco de interesse das indústrias, por exemplo o *Penicillium roqueforti*, que está associado a produção de determinados tipos de queijos (CHAVEZ, et al., 2006).

Essa espécie apresenta uma coloração verde característica desenvolvida após a divisão nuclear mitótica, produzidos em cadeia nas fialides e estão fixos nas métulas através das esterigmas (Figura 6). As células conidiogênicas são formadas após o crescimento do micélio vegetativo do fungo (GREUTER et al., 2000).

**Figura 6-** Morfologia do conidióforo de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (a); *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivado em meio BDA (b).



Fonte: (a) Kozakiewicz (1989); (b) arquivo pessoal

O micélio vegetativo é formado a partir do conjunto das hifas septadas e são encarregadas da nutrição do fungo. Segundo Peberdy (1987) essas hifas crescem de forma apical e na extremidade hifal o fungo excreta seus metabólitos secundários, entre os quais as enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006) que podem ser de vários grupos, cada um com características específicas (BHAT, 2000).

Devido ao potencial dos fungos, vários pesquisadores tem direcionado os estudos na produção de enzimas por meio de fermentação. Por exemplo, Almeida (2012) estudou a produção de xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em FES utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, os resultados da pesquisa mostraram que a produção de xilanase por *P. variable* foi de 95,261 UI/g. Terrasan (2011) também estudou a produção de xilanase por FES por *Penicillium janczewskii* no bagaço de malte, observando melhores atividades de xilanase (239,2 U/g) em culturas com 7 dias de incubação, e de exo-

xilosidases em culturas de 8 dias (0,285 U/g).

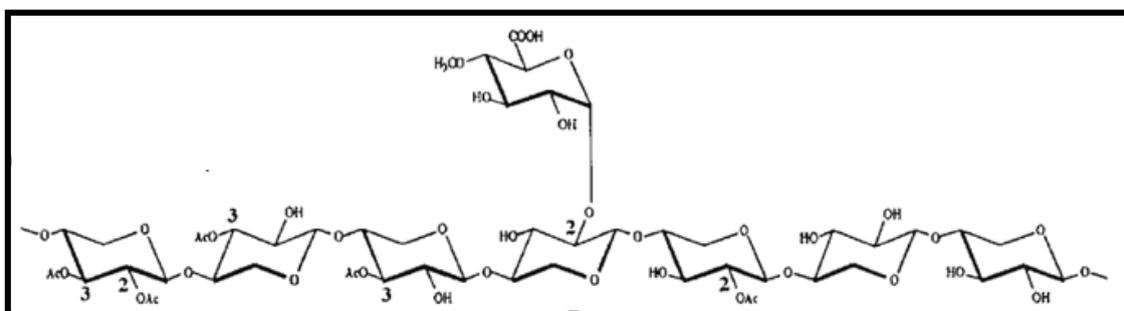
### 3.6 Xilana

Nos resíduos lignocelulósicos são encontrados diferentes grupos de polímeros, cuja a função é auxiliar na estrutura e características da parede celular, conferindo proteção contra diversos fatores externos (variação climáticas e tipos de pragas). Essa proteção ocorre de forma diferente em cada resíduo devido a variada composição de celulose, hemicelulose, substâncias pécnicas, proteínas e lignina que dependem do tipo de células, idade, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002).

Mas dentre os variados polímeros que compõem a parede celular, a hemicelulose é a mais presentes nos resíduos, sendo grande parte constituída por moléculas pequenas de monossacarídeos (COUGHLAN, 1992). A classificação deste polímero é feita de acordo com o tipo de açúcar, sendo que a maior classe é a xilana que depois da celulose é o polissacarídeo mais abundante correspondendo 1/3 de toda massa orgânica retornável da terra (madeira e resíduos agrícolas) (PRADE, 1995). A xilana é encontrada na matriz da parede celular formando uma camada entre a lignina, celulose e outros polímeros interagindo entre si via ligações covalentes e não-covalentes (BEG et al., 2001).

A formação estrutural da xilana é complexa, contendo ramificações que variam de acordo a fonte e a espécie orgânica da qual a xilana foi isolada. No entanto, a cadeia principal da xilana (Figura 7), é formada por unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4), podendo ser substituídas em diferentes graus por glicuronopiranosil, 4-O-metil-D-ácido glicurônico,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (arabinoxilanas), acetil, ácido ferúlico e/ou p-cumário como grupo lateral (KULKARNI, et al., 1999).

**Figura 7** - Composição da O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (xilana de madeira dura)



Fonte: Sunna e Antranikian (1997).

O grau de polimerização e a quantidade de ramificações variam de acordo o tipo de resíduo lignocelulósicos, nos cereais, por exemplo, as xilanas são tipicamente conhecidas

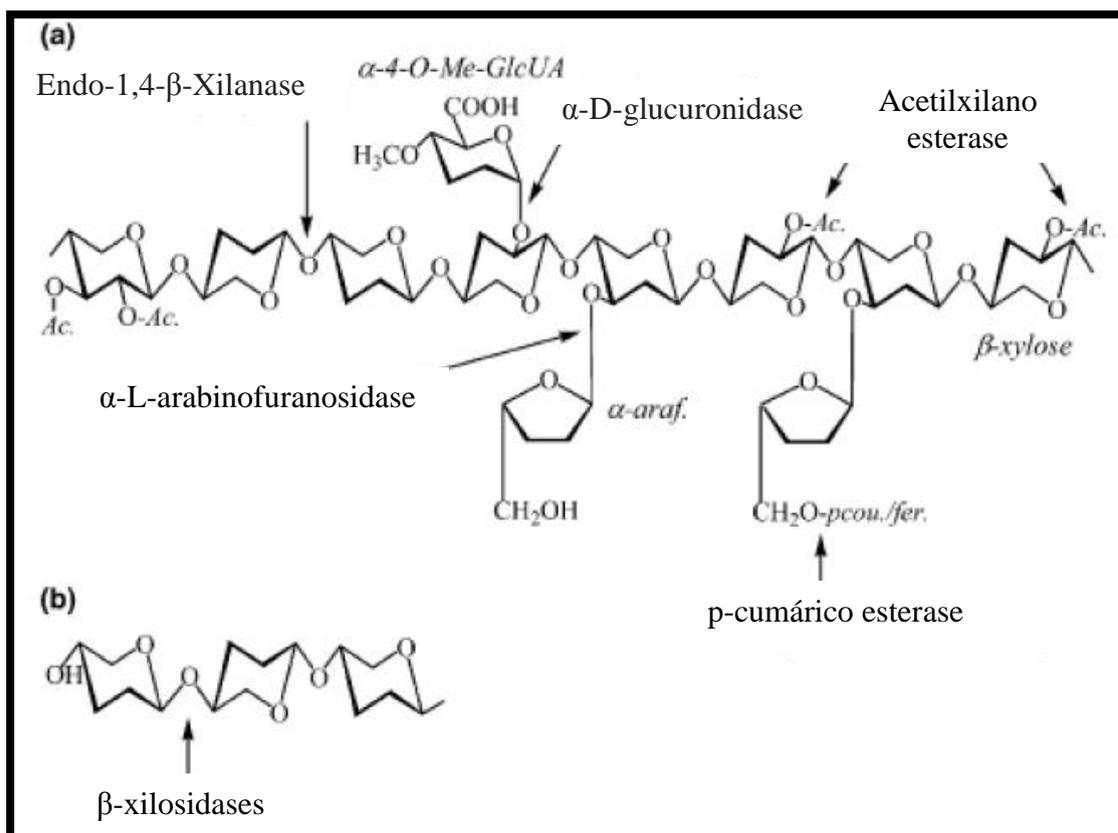
como arabinoxilanas (arabinose/xilose - AX) pois apresentam como grupo substituinte moléculas de L-arabinose ligadas ao carbono C-2 e/ou C-3 da xilose através de uma ligação glicosídica ( $\alpha$ -1,2) e/ou ( $\alpha$ -1,3). Assim as arabinoxilanas presente nos cereais, também são denominadas pentosanas e possuem maior solubilidade em água e em soluções alcalinas do que as xilanas de materiais lignocelulósicos devido a sua estrutura ramificada (KULKARNI, et al., 1999).

### **3.6.1 Enzimas xilanolíticas**

As xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas hidrolíticas que despertam grande interesse industrial, devido a sua capacidade de clivar as ligações glicosídicas da cadeia principal e das cadeias laterais do polissacarídeo xilana presente na parede celular, sendo liberado no processo xilo-oligossacarídeos e xilose, açúcares essenciais ao crescimento dos probióticos (BUTT et al., 2008).

O número de ligações glicosídicas hidrolisadas é relacionado às características específicas da xilanase empregada no processo (COLLINS, et al., 2005). Endo- $\beta$ -xilanases (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) são as principais enzimas do sistema xilanolítico, responsáveis pela quebra das ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4) da cadeia principal da xilana e são uma alternativa viável a processos de biotransformação, mas elas não são as únicas e outros tipos de enzimas também estão presentes como as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, acetilxilano esterase,  $\alpha$ -D-glucuronidase, ácido ferrúlico esterase e ácido p-cumárico esterase (Figura 8) (BEG et al., 2001; PRADE, 1995).

**Figura 8** - (a): Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. (b): Hidrólise de xilo-oligossacarídeo pela  $\beta$ -xilosidase .



Fonte: Adaptado de Collins (2005)

As  $\beta$ -xilanas são consideradas exo-enzimas e atacam diretamente a xilobiose e grupos de xilo-oligossacarídeos advindos da ação das endo-xilanas (Figura 8(b)), que também liberam xilose durante o processo hidrolítico. Kurakabe et al. (1997), afirmaram em seus estudos que as  $\beta$ -xilanas purificadas não apresentam a capacidade de hidrolisar a xilana, no entanto, sua máxima ação é na xilobiose mas também apresenta afinidade por xilo-oligossacarídeos, sendo a força de conversão inversamente proporcional a seu grau de polimerização. Portanto o complexo xilanolítico tem a habilidade de hidrolisar xilo-oligômeros a xilose, uma fonte primária de carbono que pode substituir a glicose e ser utilizada por microrganismos como fonte de carbono (FINELL et al., 2002).

As endo-1,4- $\beta$ -xilanas têm ação direta à clivagem das ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana, provocando uma redução no grau de polimerização do substrato (Figura 7(a)). A ação dessas enzimas na xilana não ocorre de forma aleatória, mas as ligações selecionadas para a hidrólise dependem da natureza da molécula de substrato, ou seja, do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes (REILLY 1981; PULS e POUTANEN 1989; LI et al. 2000).

### 3.7 Classificação enzimática

Nos estudos realizados por Biely (1985), as enzimas do complexo xilanolítico foram divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase e acetilesterase). Segundo Wong et al. (1988), as xilanases também podem ser classificadas com base nos produtos finais de reação: xilanases não desramificantes, que não hidrolisam pontos de ramificação de arabinoxilanos, não liberando arabinoses; e as desramificantes que os hidrolisam, liberando arabinoses.

No entanto, estes mesmos pesquisadores classificaram as xilanases produzidas por fungos de acordo com suas propriedades físico-químicas, como massa molecular e ponto isoelétrico, além das diferenças catalíticas. De acordo com essa divisão, há dois grupos: o primeiro em que se enquadram as enzimas com massa molecular maior que 40 kDa e baixos valores de ponto isoelétrico (predominância de aminoácidos ácidos), enquanto que o segundo grupo é formado por enzimas com massa molecular menor que 40 kDa e altos valores de ponto isoelétrico (predominância de aminoácidos básicos), mas exceções existem.

### 3.8 Sistema xilanolítico

As enzimas xilanolíticas com diferentes características físico-químico podem ser produzidas no processo fermentativo por microrganismos (fungos e bactérias). Dentre as enzimas produzidas por fermentação por meio fúngico, a massa molecular varia entre 10.000 e 83.000 Daltons e seus pontos isoelétrico (pI) estão entre 3,4 e 9,6 (ZANOELO, 2001).

Segundo Prade (1995), estas enzimas apresentam especificidades e modos de ação diferentes (endo-xilanases e  $\beta$ -xilosidases) mas complementares entre si. A capacidade hidrolítica das endo-xilanases aumenta com o comprimento da cadeia, enquanto que a ação hidrolíticas da  $\beta$ -xilosidases é diminuída.

A produção das enzimas xilanolíticas variam de acordo com os substratos, sendo algumas xilanases produzidas em menor quantidade, devido as condições de cultivo não induzirem sua produção ou ainda porque são perdidas devido à degradação ou adsorção pelo substrato (WONG, et al., 1988). Outro fator é a alta massa molecular da xilana que não pode entrar na célula e então não pode diretamente induzir a síntese das enzimas xilanolíticas. São os fragmentos da xilana (xilose, xilobiose e xilo-oligossacarídeos), que por terem baixo peso molecular, vão ter ação na biossíntese de xilanase (KULKARNI et al., 1999). Em geral, a indução de xilanases é um fenômeno complexo e o nível da resposta a um indutor individual

varia com os organismos.

### 3.9 Fatores gerais que afetam a produção de xilanase

A produção de xilanase por microrganismos exige o controle de fatores internos e externos ao ambiente de fermentação como: o microrganismo e o substrato utilizados, a composição do meio, atividade de água, aeração, pH, temperatura, tempo de cultivo e a concentração do inoculo (SHAH e MADAMWAR, 2005).

O rendimento da produção de xilanase é governado por alguns fatores chave, além dos parâmetros padrões. Quando a produção da enzima é realizada em substratos heterogêneos complexos, vários fatores têm um efeito combinado sobre o nível de expressão de xilanase: a acessibilidade, a taxa, a quantidade e a natureza química dos xiloligossacarídeos liberados do substrato, e a quantidade da xilose liberada, que age na maioria dos casos, como fonte do carbono e como inibidor da síntese de xilanase. As xilanases ligam-se firmemente ao substrato e uma parte da enzima produzida durante a fermentação frequentemente é perdida junto com o substrato insolúvel. As enzimas metabólicas produzidas no processo tais como as proteases e as transglicosidases afetam também o rendimento real da produção de xilanase (HRMOVA, et al., 1991).

### 3.10 Aplicação industrial da xilanase

Nos últimos anos, o emprego de enzimas xilanolíticas na indústria tem aumentado consideravelmente, devido a vasta aplicação em preciosos industriais, como por exemplo, na produção de xilitol (PARAJÓ, et al., 1998). No entanto, a degradação da xilana em  $\beta$ -D-xilopinanosil e seus oligossacarídeo, na maioria dos casos, era conduzida por hidrólise ácida que induzia a formação de substâncias tóxicas que poderia dificultar o processo de fermentação microbiana. Além disso, no longo prazo, pode levar à corrosão do equipamento metálico que entra em contato com as substâncias ácidas (POLIZELI, 2005).

Entretanto, as indústrias têm mostrado interesse no desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes para serem utilizados em substituição à hidrólise ácida de materiais hemicelulósicos, assim, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. e *Humicola insolens* tem sido sugeridos e empregados na produção de enzimas xilanolíticas que hidrolisam a xilana sem a liberação de substâncias tóxicas (POLIZELI, 2005).

O processo de degradação da xilana em açúcares mais simples pelo uso de enzimas, se difundiu década de 1980, quando se aplicou as enzimas no melhoramento da

digestibilidade das rações destinada a animais, clarificação de bebidas como cervejas e sucos, branqueamento da polpa do papel, reciclagem de resíduos agrícolas e florestais, e produção de biocombustível (SORENSEN et al., 2004).

Na alimentação animal, as xilanases juntamente com outras enzimas (glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases), melhoram o ganho de peso das aves, pois facilita o acesso à fonte de nutrientes e/ou liberação de compostos proteicos presente nas rações (aveia, arroz e trigo). Esse melhoramento da dieta animal é decorrente da redução da viscosidade da matéria prima devido a degradação da arabinoxilanos (encontrados nas paredes celulares de grãos) que são componentes anti-nutricionais e que na forma solúvel podem aumentar a viscosidade da alimentação ingerida (o que interfere com a mobilidade e a absorção de outros componentes) (BEG et al., 2001)

Segundo Beg et al. (2001), as xilanases podem ser direcionadas para o melhoramento do processo de fabricação de pães, atribuindo mudanças desejáveis às propriedades reológicas da massa, tendo como resultado uma consistência mais firme, com maior extensibilidade e resistência à quebra. A ação das xilanases nesse caso ocorre em conjunto com as  $\alpha$ -amilase, e outras hemicelulases. Esse grupo enzimático quebra a hemicelulose na farinha de trigo, ajudando na redistribuição de água que resulta numa massa mais macia (HARBAK e THYGESEN 2002; CAMACHO e AGUILAR, 2003).

Conforme já foi mencionado, nas indústrias de suco, vinho e cervejas as xilanases também são amplamente empregada devido à diminuição da viscosidade e redução da opacidade da bebida, resultando em custos de operação menores. Essa técnica foi desenvolvida na década 1930 quando os rendimentos de sucos cítricos eram baixos em decorrência dos problemas encontrados na filtração. As xilanases influenciam no aumento de ligações dos fragmentos de arabino-xilanas à água melhorando a filtração e prevenindo o entupimento das membranas filtrantes (SORENSEN et al., 2004).

As xilanase juntamente com outras enzimas hemicelulolíticas, podem também ser destinadas ao bioprocessamento de resíduos lignocelulósicos visando a geração de combustíveis como etanol e xilitol e segundo Viikari et al. (1987), as xilanases podem ainda ser empregadas em uma etapa de tratamento da polpa de papel com hemicelulases, diminuindo gastos para a indústria por conta da redução de cloro para o branqueamento papel.

#### **4 REFERÊNCIAS**

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, p.145 2012

ANDRADE, S. V.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. Effect of carbon source on the biochemical properties of the  $\beta$ -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochem**, v. 39, p.1931–1938, 2004.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, 2004.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Manage**. v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BEG, Q. K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L; HOODAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 56, p.326-338, 2001.

BHAT, M. K. Research review paper cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, WI. LIMA, V.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biociologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA. v.3: p. 247-276, 2001.

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

BIZ, A; FINKLER, A. T. J; PITOL, L. O; MEDINAA, B. S; KRIEGER, N. MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor, **Biochemical Engineering Journal**, v.111, p,54–62, 2016.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z, SULTAN, M. T. Xylanases in Baking Industry, **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, p.22–31, 2008.

CAMACHO, N. A.; AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.104, p.159-172, 2003.

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 413-433, 2006.

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

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J; VAM SOSEREN, M. A.K.; BELDMAN, G.; VOROGEN, A. G. J. Xylan and xylanases. **Elsevier Science Publishers**, v.1 p. 111-139. 1992.

FINELL, J.; JOKELA, J.; LEISOLA, M.; RIEKKOLA, M. L. Total hydrolysis of xylofuranose and xylobiose by soluble and cross-linked crystalline xylanase II from *Trichoderma reesei*. **Biocatal. Biotransfor**, v.20, p.281-290, 2002.

FERRAZ, J. L. A. A.; SOUZA, L. O.; SILVA, T. P.; REIS, N. S.; BRITO, A. R.; Franco, Marcelo. Perfil da produção de xilanase por *Penicillium Roqueforti* através da fermentação em estado sólido de resíduo de cajá. In: 68 Reunião **Anual da SBPC**, v. 68, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/pt/>> Acesso em: 10 Jan. 2017.

FORSTER-CARNEIRO, T.; M.D. BERNI, M. D.; DORILEOC, I. L; ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v.77, p.78–88, 2013.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E, P. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act *synergistically* in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**. v. 51, p. 72-78, 2010.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solidstate fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**. v. 144, p. 1-22, 2008.

GREUTER, W.; MC NEILL, J.; BARRIE, F. R.; BURDET, H. M.; DEMOULIN, V.; FILGUEIRAS, T. S; NICOLSON, D. H.; SILVA, P. C.; SKOG, J. E, TREHANE, P.; TURLAND, N. J.; HAWKSWORTH, D. L. **International code of Botanical Nomenclature**. Konigstein: Koeltz Scientific Books (Saint Louis Code), p. 474,2000.

GUIMARÃES, L. H. S.; NOGUEIRA, S. C. P.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

HARBAK, L.; THYGESSEN, H. V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food Chemical Toxicology**, v.40, p. 1–8, 2002.

HOUBRAKEN, J; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**. V. 70:p. 1-51. 2011.

HRMOVA, M.; PETRAKOVA, E.; BIELY, P. Induction of cellulose and xylandegrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. **General microbiology**, v. 137 p.541-547, 1991.

HSU, P.; LIU, C.; LIU, L.; CHANG, C.; YANG, S. Protein enrichment and digestionimprovement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46(3), p. 171-179, 2012.

HUANG J. CHEN, D.; WEI, Y.; WANG, Q.; LI, Z.; CHEN, Y.; HUANG, R. Direct Ethanol Production from Lignocellulosic Sugars and Sugarcane Bagasse by a Recombinant *Trichoderma reesei* Strain HJ48. **The Scientific World Journal**, v.1, p.1-8, 2014.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Paperrrs**, Netherlands, v. 161, p. 1-188, 1989.

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

KUMAR, N. S. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. Using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150–158, 2013.

KURAKABE, M, SHINJII, O, KOMAKI, T. Transxylosilation of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 6112, p. 2010–2014, 1997.

LEITE, P; SALGADO, J. M; VENÂNCIO, A; DOMÍNGUEZ, J. M; BELO, I. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 737–746, 2016.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; KARL-ERIK, E.; L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**. v.27, p. 89–94, 2000.

LI, L.; ZHU, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; CHEN, W. Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on metal-chelate Eupergit C 250L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 278 – 285, 2007.

MAITI, S. SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; YANN LE BIHAN, Y. L.; DROGUI, P.; GERARDO BUELNA, G.; VERMA. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, 217–226, 2016.

MALIK, A., GROHMANN, E. Environmental protection strategies for sustainable development. **Science E Business Media**. XIV, p. 650. 2012.

MEDEIROS, R. S. **Efeito da substituição do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado por sorgo na fermentação ruminal em bovinos, digestibilidade in vitro em ovinos e desempenho animal em bovino em acabamento..** 104p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NIGAM, P. S. N.; PANDEY, A. **Biotechnology for agro-industrial residues utilization: utilization of agro-residues**. Springer Science E Business Media, v. 1, 2009.

PALLU, A. P. S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero e interação com cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado e ciência) Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

PANDEY, A. Recent process development in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p.109-117, 1992.

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

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUES, H.; DOMÍNGUES, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1, interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology** 65:191–201, 1998.

PEBERDY, J. F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, v. 1, 1987.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

PRADE, R. A.; ZHANG, D-F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and lantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 361-391, 1999.

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

PULS, J.; POUTANEN, K. Mechanisms of enzyme hydrolysis of hemicelulose (xylans) and procedures for determination of the enzyme actives involved. In: COUGHLAN, M. P. (Ed.). Enzyme systems for lignocellulose degradation. **Elsevier Applied Science**, v. 32, p. 151-165.1989.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 161–179 2005.

REILLY P. J. Xylanases, structure and function. In: Hollander a **Trends in the biology of**

**fermentation for fuels and chemicals.** V. 1 p. 111–129, 1981.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J.; Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 41, 2264-2269, 2006.

RUTZ, F.; TORERO, A.; FILER, K. Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas. **Reviews Aveworld**, v. 29, 2008.

SAHA, B. C. Purification and properties of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 33–38, 2003

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, 85-94, 2009.

SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, p.188–193, 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, p. 27- 33, 2009.

SANTOS, T. C. **Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento protéico para utilização na alimentação de ruminantes.** Tese (Dissertação) Mestrado em Ciências Ambientais – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA: UESB, 2013. 128 p.

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

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C. O.; ALSINA, L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 2, p. 27-32, 2007.

SOUZA, L. O. ; FERRAZ, J. L. A. A. ; SILVA, T. P. ; REIS, N. S. ; FRANCO, M . Produção de xilanase por *Penicillium roqueforti* em cultivo em estado solido da casca de amendoim. In: Semana de Biologia da UESB, 2016, Jequié. Semana de Biologia da UESB, 2016.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRERA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAIS, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

SORENSEN, J. F.; KRAGH, K. M.; SIBBESEN, O.; DELCOUR, J.; GOESAERT, H.; SVENSSON. B; TAHIR, T. A.; BRUFAU, J; PEREZ-VENDRELL, A. M.;

BELLINCAMPI, D.; D'OIDIO, R.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; BONNIN, E.; JUGE, N. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1696, p. 275-287, 2004.

SU, C. H.; CHUNG, M. H.; HSIEH, H. J., CHANG, Y. K.; DING, J. C.; WU, H. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical**. v. 43, p. 573-577, 2012.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-64. 2002.

SUNNA, A.; ANATRAKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnonology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

TERRASAN, C. R F. **Xilanases,  $\beta$ -xilosidas de *Penicillium Janczewskii*: purificação, caracterização e aplicação no branqueamento da polpa celulósica e para ração animal**. 2011. Tese (Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2011.

THE GLOBAL METHANE INITIATIVE. **Resource assessment for livestock and agro-industrial wastes-India**, v. 1, p. 1-109, 2011.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

UNICA – União das Indústrias de Cana-de-açúcar. **UNICA revisa projeção para safra 2014/2015, aponta moagem maior mas queda na produção total de açúcar e etanol no Centro-Sul**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn =40>>. Acesso em: 12 Jun. 2016.

VIKARI, L; POUTANEN, K; RATTO, M; PULS, J. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 49-60, 1987.

VIRMOND, E.; ROCHA, J.; MOREIRA, R.; JOSÉ, H.; Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 197-230, 2013.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C. P. F.; SEGERSTEDT, A. Sustainability assessment of bio- ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energy Policy**, v. 39, p. 5703-5716, 2011.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99, p. 23-31, 2012.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U.; SANDDLER, J. N. Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Canadian journal and microbiology**, v. 32, p. 570-576, 1986.

WULFF, N. A. **Caracterização enzimática das celulases xf-810, xf-818 e xf-2708 de Xylella fastidiosa e purificação da proteína xf-818, expressas em escherichia coli** 2002. 195p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ZANOELO, F. F, POLIZELI M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant  $\beta$ -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p. 170–176, 2004.

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

## **CAPÍTULO 2 -** Otimização de Xilanase por *Penicillium Roqueforti* produzida por meio da fermentação em estado sólido a partir do bagaço da cana-de-açúcar.

### **RESUMO**

A reutilização de resíduos agroindustriais e agrícolas em processos de biotransformações por fermentação, é promissor devido à necessidade das indústrias por enzimas que aumentem a eficiência do processo e minimizem o custo e o impacto das operações. Estes resíduos orgânicos são de fácil disponibilidade e ricos em celulose, hemicelulose e lignina, como exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização do bagaço da cana-de-açúcar como substrato para a produção das xilanases por meio da fermentação em estado sólido (FES) empregando *Penicillium roqueforti*. Foram avaliadas as melhores condições para a produção de um extrato enzimático bruto com atividade das xilanases por meio de um planejamento experimental do tipo Box-Behnken (PBB) em que os fatores analisados foram a umidade (U, %), a temperatura (T, °C) e o tempo de fermentação (t, h). O modelo obtido para a atividade das xilanases (XIL, UI/g) foi validado com a repetição das condições ótimas teóricas ( $UD = 64\%$ ,  $T = 23^{\circ}\text{C}$  e  $t = 93$  h) que resultaram num valor de  $XIL = 20,65$  U/g, o que equivale a um desvio de 3,5% do valor teórico e uma produtividade de 19,95 UI/g. A comparação das análise físico-química do bagaço in natura e fermentado demonstraram a afinidade do *P. roqueforti* ATCC 10110 pela degradação do micronutrientes presente no bagaço da cana, sendo encontrado uma queda de aproximadamente 50% dos nutrientes após a fermentação, e a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura verificou-se a ação do fungo sobre o substrato. Portanto, conclui-se que no processo fermentativo o fungo sintetizou e excretou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor além do resíduo da cana, confirmando assim a viabilidade da utilização do mesmo como matéria-prima para a fermentação no estado sólido.

**PALAVRAS CHAVES:** Resíduo, produção, enzima.

## **ABSTRACT**

The reuse of agroindustrial and agricultural residues in fermentation biotransformations processes is promising due to the need of the industries for enzymes that increase the efficiency of the process and minimize the cost and impact of the operations. These organic wastes are readily available and are rich in cellulose, hemicellulose and lignin, for example, sugarcane bagasse. Thus, the objective of this work was to evaluate the use of sugarcane bagasse as a substrate for the production of xylanases by means of solid state fermentation (FES) using *Penicillium roqueforti*. The best conditions for the production of a crude enzymatic extract with xylanase activity were evaluated using a Box-Behnken (PBB) experimental design in which the factors analyzed were moisture (U,%), temperature (T, ° C) and the fermentation time (t, h). The model obtained for xylanase activity (XIL, UI / g) was validated with the repetition of theoretical optimum conditions (UD = 64%, T = 23 ° C et = 93 h), resulting in a value of XIL = 20.65 U / g, which corresponds to a deviation of 3.5% of theoretical value and a productivity of 19.95 IU / g. The comparison of the physical and chemical analysis of the in natura and fermented bagasse demonstrated the affinity of *P. roqueforti* ATCC 10110 for the degradation of the micronutrients present in the sugarcane bagasse, being found a drop of approximately 50% of the nutrients after the fermentation, and from the Scanning electron microscopy technique showed the action of the fungus on the substrate. Therefore, it is concluded that in the fermentation process the fungus synthesized and excreted the enzyme without the need of any other inducer besides the cane residue, thus confirming the feasibility of using the same as a raw material for the solid state fermentation.

**KEY WORDS:** production, enzyme, residue

## 1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a todos os setores produtivos, e a cada ano o setor industrial apresenta um aumento em sua produção para equilibrar a demanda de bens e serviços (GALEMBECK, et al., 2009). E a alta produção nos setores agroindustriais, gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos como o bagaço da cana-de-açúcar. Assim, o volume excessivo dos resíduos pode ocasionar sérios problemas ecológicos por conta do descarte inadequado.

No entanto, as biomassas vegetais são ricas em micronutrientes que podem ser direcionados ao setor biotecnológico e oferecerem oportunidades para o aproveitamento econômico destes resíduos ao aplica-los na produção de enzimas de interesse comercial, cujo o uso resulte no melhoramento dos processos e no desempenho dos produtos já existentes no mercado. Aliado a isso, a aplicação de extratos enzimáticos brutos também é vantajosa pois enzimas puras, apresentam elevado custo e por conseqüências, limitações de uso (PARK et al., 2002).

A produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) têm se destacado por se tratar de uma técnica de baixo custo e boas produtividades, especialmente com fungos filamentosos que são cultivados, por exemplo, em partículas porosas de um certo resíduo e umedecidas (THOMAS, et al., 2013). Os fungos são considerados os microrganismo mais promissores empregados na fermentação pela variedade de produtos excretados, devido ao desenvolvimento das hifas no substrato poroso, o que favorece a produção e obtenção de diversas enzimas. Dentre estes microrganismos, o gênero *Penicillium* tem demonstrado uma adaptação promissora no setor biotecnológico decorrente dos metabólitos secundários produzidos durante o processo fermentativo e tem sido estudado quanto a produção de endoglucanase e celulasas totais (complexo exoglucanases e endoglucanases) no substrato de jaca, apresentado atividade 1,51 U/g (SOUZA et al., 2016).

As xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas hemicelulolíticas que hidrolisam as ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) da xilana, sendo liberado no processo xilo-oligossacarídeos e xilose (BUTT et al., 2008). Essa enzima tem despertado o interesse industrial para diversos processos que envolvam a degradação da xilana, como por exemplo, na indústria de bebidas para a clarificação de sucos e vinhos.

Deste modo, a busca pelo aprimoramento da obtenção de enzimas de interesse industrial empregando substratos de grande disponibilidade e baixo custo tem sido uma realidade atual e tem incentivado diversos estudos biotecnológicos, além disso, sabe-se que

o uso de biocatalisadores é vantajoso em relação aos catalisadores químicos, por aqueles serem mais específicos que estes e por não gerarem compostos tóxicos. Considerando os aspectos discutidos, o objetivo desse trabalho foi avaliar as melhores condições de produção das xilanases por *P. roqueforti* ATCC10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e caracterizar o extrato enzimático bruto obtido além de caracterizar morfológicamente as partículas do resíduo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Resíduo de cana-de-açúcar**

O bagaço da cana-de-açúcar foi obtido no comércio local da cidade de Itapetinga – BA, a partir da extração do caldo de cana pelo comerciantes. O material foi seco em estufa com circulação forçada de ar por 24 h a 65°C. Após a secagem, o resíduo foi triturado em triturador tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) para a obtenção de partículas com 2 mm de diâmetro. O material obtido foi denominado resíduo da cana e foi armazenado em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento de serem utilizados. Para as fermentações, 5 g de resíduo foram autoclavados a 121 °C e 1 atm por 15 min em Erlenmeyers.

### **2.2 Condições de cultivo do microrganismo**

Neste estudo foi utilizado o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ), sendo esta cepa isolada, caracterizada e depositada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Rio de Janeiro, RJ), sob o registro de número: 40075 e lote: 079840075. Este fungo vem sendo periodicamente preservado em sílica e glicerol e mantido em ultra-freezer à temperatura de – 80 °C. A inoculação deste fungo foi realizada em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e sua incubação conduzida a 30 °C em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) durante 7 dias. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa em solução Tween 80 (0,01%, v/v), ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 min. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer.

### **2.3 Caracterização do resíduo**

Para o resíduo obtido foram determinados os teores de: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), hemicelulose, (HM) celulose (CE) e lignina, (LIG) fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), de acordo os métodos propostos por Silva e Queiroz (2009). Todos os valores obtidos foram expressos em g/100 g de matéria seca.

### **2.4 Análise de microscopia de varredura do bagaço da cana-de-açúcar**

A análise de imagem das partículas de bagaço de cana-de-açúcar antes e após a fermentação foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC-Bahia). Para a análise, foram retirados fragmentos de aproximadamente 2mm do bagaço in natura e fermentado pelo fungo na condições experimentais ótimas estimada pelo modelo estatístico; estes fragmentos foram fixados a um suporte “Stub” e as micrografias foram realizadas em modo ambiente que é utilizado para investigar amostras incompatíveis com alto vácuo e por isso, impossíveis de serem analisadas por outros métodos tradicionais. Os fragmentos do bagaço in natura e fermentada foram fotografados em aumentos de 100, 300 e 1000x.

## 2.5 Fermentações em estado sólido (FES)

Para cada fermentação, foram empregados 5 g do resíduo (autoclavados como mencionados anteriormente). Este material autoclavado foi disposto em cabine de segurança biológica sob incidência de luz ultravioleta até seu resfriamento e só então umedecido com água destilada até atingir a umidade desejada e inoculado com a suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/g de resíduo (TUNG, MIYATA e IWAHORI, 2004). Os valores de umidade inicial do meio foram ajustados de acordo com a relação apresentada na Equação 1, sendo  $UD$  a umidade (%) desejada e determinada por analisador de umidade infravermelho (modelo MOC 63) e  $V$  o volume de água adicionado por massa de substrato (mL/g). As fermentações foram conduzidas em três incubadoras BOD em diferentes temperaturas e o tempo de fermentação foi avaliado mediante a retirada das amostras em diferentes intervalos de tempo e imediata realização dos processos de extração e determinação da atividade das xilanases. Diferentes condições de temperatura e tempo de incubação também foram avaliadas.

$$V = \left( \frac{0,9538.U}{100-U} \right) - 0,3805 \quad \text{Equação (1)}$$

## 2.6 Preparo do extrato enzimático bruto

Finalizado o respectivo tempo de fermentação, a cada ensaio foi adicionado 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e os Erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 35°C por 10 min e 170 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. A

parte sobrenadante, denominada extrato enzimático bruto, foi utilizada para a determinação da atividade de xilanase.

## 2.7 Otimização da produção de xilanase

A otimização das condições de cultivo em FES do *P. roqueforti* ATCC 10110 em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada por meio de um delineamento do tipo Box-Behnken. Para este fim, foram analisadas três variáveis independentes do processo fermentativo em três níveis (Tabela 1): umidade inicial (*UD*, %), temperatura de incubação (*T*, °C) e tempo de fermentação (*t*, h), com 12 experimentos diferentes e 3 repetições dos pontos centrais, totalizando 15 experimentos.

**Tabela 1** - Níveis e variáveis estudadas no delineamento Box–Behnken para avaliação da melhor produção da xilanase.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	18	25	32
Umidade (%)	50	65	80
Tempo de fermentação (horas)	24	72	120

Fonte: dados da pesquisa

A variável resposta analisada foi a atividade de xilanase (*XIL*, UI/g) determinada no extrato multienzimático bruto e o modelo quadrático foi ajustado a partir dos dados obtidos, e a validação foi determinada por meio da análise de variância (ANOVA), e a partir do modelo, foram obtidos o ponto de ótimo, a superfície de resposta e a curva de contorno (Rodrigues, et al 2014). Foi utilizado o software Statistica versão 10 (STATSOFT) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

## 2.8 Determinação da atividade de xilanase

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos com base em procedimentos padrão recomendados pela comissão sobre Biotecnologia, IUPAC (GHOSE e BISARIA, 1987). A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de 1 mL de xilana de *beechwood* (Sigma®), na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído) em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Para o controle da reação foram incubados 1 mL de tampão citrato de sódio com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído), enquanto que o branco da reação consistiu de 1 mL de tampão

citrato de sódio e 1 mL da solução de xilana. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método adaptado de Miller (1959), adicionando-se 2 mL de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) a 1ml dos meios de reação seguido de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente de torneira. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foram lidos em espectrofotômetro a 540 nm e convertida em atividade enzimática a partir de uma curva analítica de xilose. Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto, a 50 °C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g).

## 2.9 Curva de xilose

A curva analítica de xilose para os ensaios de atividade de xilanase foi determinada nas concentrações de 0 a 1  $\mu$ mol/mL. Para isso, foram tomados em tubos de ensaio (em triplicata) os respectivos volumes de solução estoque de xilose (0,01M), tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) e DNS conforme a Tabela 2.

**Tabela 2-** Volume de soluções utilizadas para construção de curva analítica de calibração de xilose.

Tubo	Volume (mL)		
	Solução de xilose (0,01 M)	Tampão citrato de sódio	DNS
0	0	1,5	2,0
1	0,1	1,4	2,0
2	0,2	1,3	2,0
3	0,3	1,2	2,0
4	0,4	1,1	2,0
5	0,5	1,0	2,0
6	0,6	0,9	2,0
7	0,7	0,8	2,0
8	0,8	0,7	2,0
9	0,9	0,6	2,0
10	1,0	0,5	2,0

Fonte: dados da pesquisa

Os tubos foram então agitados e aquecidos durante 5 min em banho-maria em água fervente ( $\pm 100$  °C), rapidamente resfriados em água corrente e adicionados de 6 mL de água destilada. Após homogeneização, as leituras das respectivas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3 RESULTADO E DISCURSÃO

#### 3.1 Otimização na produção de xilanase

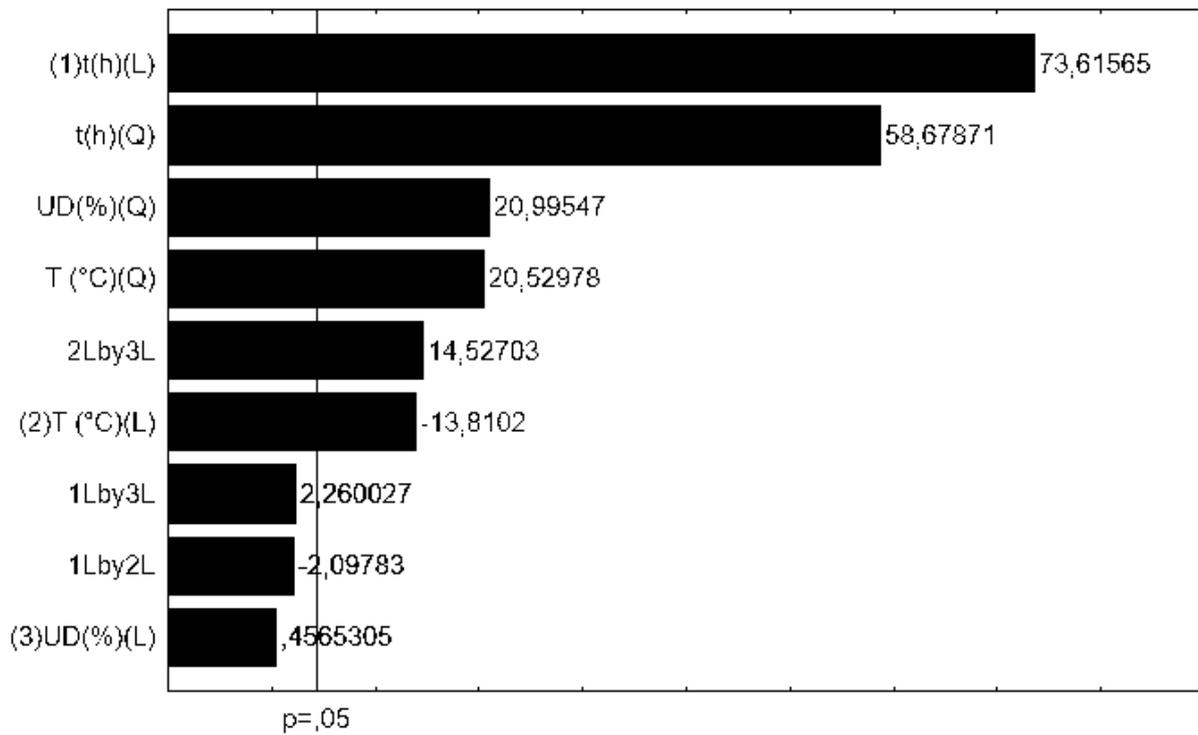
Com base nas condições de análise determinadas pela matriz do delineamento Box-Behnken, obteve-se as respostas desejadas para a atividade de xilanase (Tabela 3) e a análise dos efeitos dos fatores sobre a resposta, apresentada como gráfico de Pareto (Figura 1), na qual foi incluído os termos lineares da temperatura e da interação da temperatura com a umidade, no intervalo de confiança de 95%. Assim, apenas os termos linear da umidade e as interações do tempo foram removidos do modelo.

**Tabela 3** – Matriz de Box-Behnken para as variáveis independentes: tempo ( $t$ , h), temperatura ( $T$ , °C) e umidade ( $UD$ , %) e a variável dependente; atividade de xilanase ( $XIL$ , UI/g) obtida no extrato enzimático proveniente do cultivo de *P. roqueforti* em 5 g de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	$t$ (h)	Fatores			Resposta $XIL$ (UI/g)
		$T$ (°C)	$UD$ (%)		
1	-1 (24) <sup>a</sup>	-1 (18)	0 (65)	8,01	
2	1 (120)	-1 (18)	0 (65)	18,53	
3	-1 (24)	1 (32)	0 (65)	6,68	
4	1 (120)	1 (32)	0 (65)	16,54	
5	-1 (24)	0 (25)	-1 (50)	9,54	
6	1 (120)	0 (25)	-1 (50)	15,46	
7	-1 (24)	0 (25)	1 (80)	8,98	
8	1 (120)	0 (25)	1 (80)	15,62	
9	0 (72)	-1 (18)	-1 (50)	17,25	
10	0 (72)	1 (32)	-1 (50)	13,52	
11	0 (72)	-1 (18)	1 (80)	15,26	
12	0 (72)	1 (32)	1 (80)	16,13	
13	0 (72)	0 (25)	0 (65)	19,14	
14	0 (72)	0 (25)	0 (65)	18,88	
15	0 (72)	0 (25)	0 (65)	18,85	

<sup>a</sup> Os valores reais das variáveis independentes se encontram entre parênteses. Fonte: dados da pesquisa

**Figura 1-** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis umidade (U), temperatura (°C) e tempo de fermentação (T) utilizada na produção de xilanase



O modelo quadrático estatisticamente significativo a 95% de confiança que descreve a produção de xilanase ( $XIL$ , UI/g) por *P. roqueforti* através do resíduo da cana é apresentado pela Equação 2, para as variáveis codificadas: temperatura ( $T$ ), tempo de incubação ( $t$ ) e umidade ( $UD$ ).

$$XIL \left( \frac{UI}{g} \right) = -31,38 + 0,3838(T) - 0,0021 (T)^2 + 0,9383 (t) - 0,0345 (t)^2 - 0,0077(UD)^2 + 0,0109 x (t) x (UD) \quad \text{Eq. (2)}$$

O modelo, contendo apenas os termos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), foi então submetido à ANOVA (Tabela 4) e sua significância foi comprovada a 95% de confiança, sendo obtido um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9689.

**Tabela 4** -Resultados da análise de regressão para a atividade de xilanases no planejamento experimental Box–Behnken.

	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Regressão	244,3267	9	27,1474	17,330	0,003
Resíduo	7,8326	5	1,5665		
Total	252,1593	14			
Falta de ajuste	7,7825	3	2,5942	103,693	0,010
Erro puro	0,0500	2	0,0250		
R <sup>2</sup>	0,9689				
R <sup>2</sup> -adj	0,9130				

**GL** = Graus de Liberdade; **SQ** = Soma dos Quadrados; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Teste de Fisher; **P**= probabilidade **R<sup>2</sup>** = Coeficiente de Determinação. Fonte: dados da pesquisa

Como observado na Tabela 4 a regressão foi significativa ( $p = 0,003$ ), mas apresentou falta de ajuste significativo ( $p = 0,010$ ). Para validação do modelo matemático pelo planejamento Box–Behnken foi realizado um teste em triplicada na condição experimental ótima sugerido pelo modelo e pontos distintos gerados pelo programa estatístico com base nas respostas dos ensaios avaliados. As variáveis independentes analisadas estão dispostas na Tabela 5.

**Tabela 5**– Condições experimentais para os fatores: tempo ( $t$ ), umidade ( $UD$ ) e temperatura ( $T$ ) para a validação do modelo matemático obtido do planejamento Box-Behnken para resposta: atividade de xilanase ( $XIL$ ).

<b>Ensaio</b>	<b>Fatores</b>			<b>Resposta (XIL)</b>		
	<b><math>t</math> (h)</b>	<b><math>UD</math> (%)</b>	<b><math>T</math> (°C)</b>	<b>Valor predito (UI/g)</b>	<b>Valor experimental (UI/g)</b>	<b>Desvio (%)</b>
Ponto ótimo	93	64	23	19,95	20,65	3,5
1	36	50	32	8,05	6,83	15,19
2	48	80	20	12,71	11,57	9,00

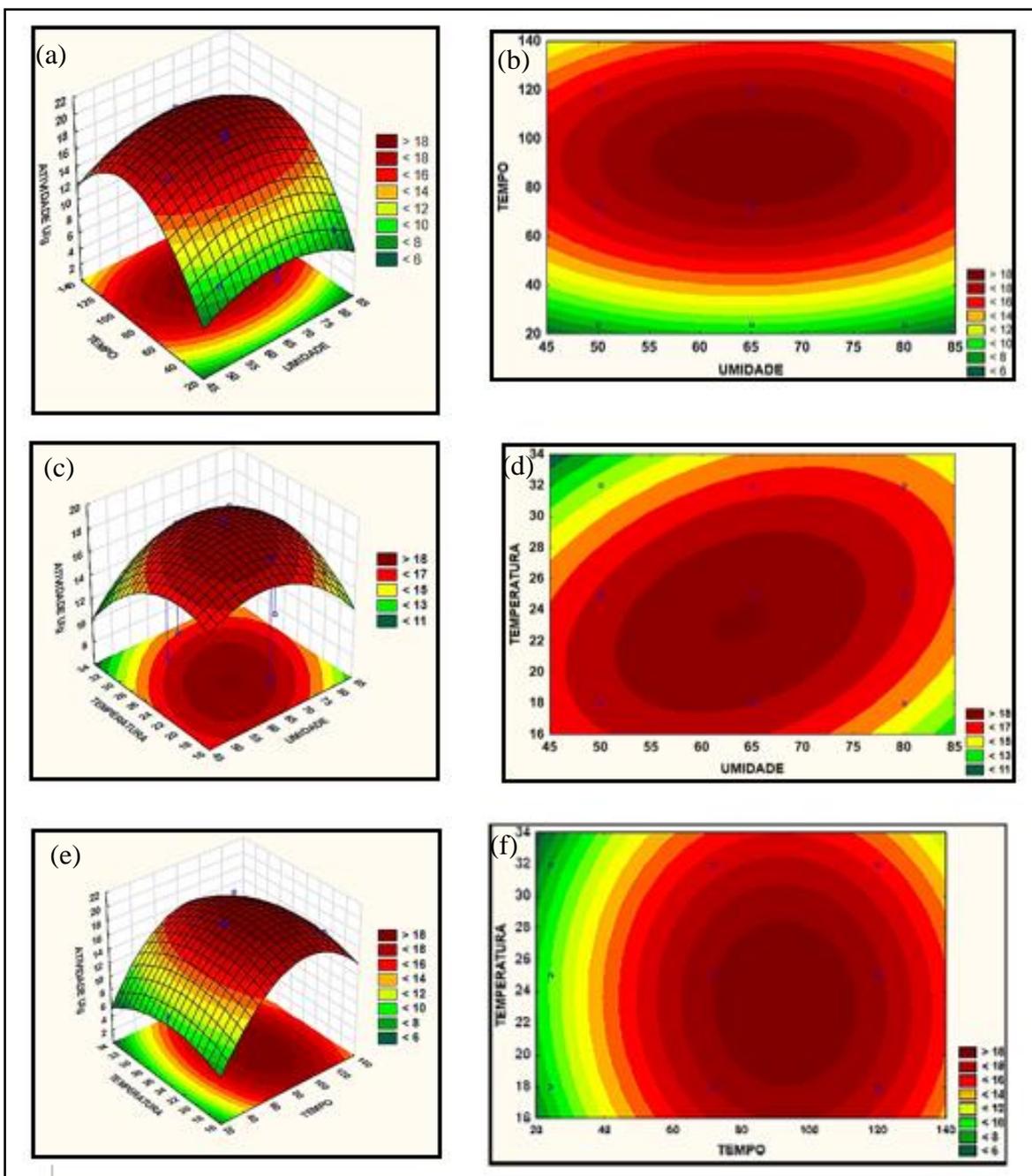
Fonte: dados da pesquisa

Cada ensaio foi realizado em triplicata e os valores experimentais da atividade de xilanase foram comparadas com os valores estimados pelo modelo. Assim, observa-se que a atividade xilanólítica encontrada no ponto ótimo foi de 20,65 UI/g, próximo do valor estimado pelo modelo (19,95 UI/g). Porém, a falta de ajuste também foi significativa ( $p \leq 0,05$ ), tornado no primeiro momento os modelos matemáticos inválidos para a realização de uma previsão. Entretanto, suspeitou-se que esses valores se tratavam de “falso positivo”,

pois foram observadas variações muito baixas no ponto central desses variáveis o que resulta em um valor de “erro puro” pequeno ( $SQ_{PE}=0,0250$ ). Matematicamente o valor e “F” para falta de ajuste é o resultado do quadrado médio da falta de ajuste ( $SQ_{LOF}=2,5942$ ), dividido pelo quadrado médio do erro puro, assim, com um denominador muito pequeno, ocorre uma tendência de aumento do resultado dessa operação. O mesmo é afirmado por Waszczyński e Nelsen (1996), condizendo que quando o quadrado médio para o erro experimental extremamente baixo, os testes de significância para a falta de ajuste devem ser considerados irrelevantes.

Desse modo, o modelo torna-se válido, além do fato que o desvio padrão (%) obtidos foram inferiores a 20 % que é um valor aceitável para a predição matemática de sistemas biológicos/bioquímicos. A partir deste modelo proposto foram obtidas as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 2), sendo a condição experimental para a variável resposta correspondente ao tempo de 93 h, umidade de 64% e temperatura de 23°C.

**Figura 29-** Superfícies de resposta – (a), (c) e (e) – e curvas de contorno – (b), (d) e (f) – para as variáveis independentes: tempo ( $t$ , h), temperatura ( $T$ , °C) e umidade ( $UD$ , %) e a variável dependente: atividade de xilanase ( $XIL$ , UI/g) obtida do cultivo de *P. roqueforti* ATCC 10110 em bagaço de cana-de-açúcar.



A partir do modelo matemático obtido (Equação 2), foram estimadas as condições experimentais ótimas de tempo, umidade e temperatura. O tempo ótimo de fermentação para que o fungo *P. roqueforti* se desenvolvesse entre as camadas internas e externas dos feixes de fibras do resíduo da cana, tendo maior acesso aos micronutrientes e maior liberação da enzima de interesse foi de 92 h. Em FES, o controle do teor de umidade é essencial para a otimização do processo pois o uso demasiado de água no meio pode interferir negativamente

sobre a porosidade do substrato reduzindo a troca de gases e por consequência diminuindo a produção da enzima; entretanto, valores muito baixo de umidade não atendem às necessidades biológicas/bioquímicas dos microrganismos (MAHANTA, et al., 2008; SANCHEZ, 2009). Assim, neste estudo o melhor valor de umidade foi cerca de 64 %. Em relação aos valores de temperatura as informações são bastante diversificadas pois cada espécie de fungo apresenta um valor de temperatura ótima de crescimento. Neste presente trabalho, foi determinada a temperatura ótima de 23 °C, e com o aumento da temperatura, observou-se uma redução na produção da xilanase.

A literatura tem relatado a produção de xilanases por diferentes microrganismos e substratos. Yin Li et al. (2007), visaram ao melhoramento da produção de xilanase por *Penicillium oxalicum* ZH-30, usando a metodologia de superfície de resposta (Box-Wilson) para três variáveis independentes (concentração do substrato, pH e tempo de cultivo) e verificaram que as condições ótimas para a maior produção de xilanase foram: 35,6 g/L de farelo de trigo, pH = 7,72 e tempo de cultivo 142,3 h. Scholl et al. (2015), estudaram a excreção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 cultivado em FES em capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, na quais apresentaram elevada atividade xilanolítica, máximo de  $571.74 \pm 27.14$  IU/g. Reis et al. (2013), avaliaram a produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 usando diferentes concentrações de celulose, o qual foi obtido 177 U/mL de xilanases. Nos estudos de Siqueira et al. (2010) utilizando o microrganismo *Mucor* sp. obteve-se uma atividade xilanolítica de 0,056 UI/ml e para o *Penicillium citrinum* uma atividade de 0,412 UI/ml. Desse modo, os resultados obtidos na produção de xilanase por *P. roqueforti* nesse estudo foram inferiores ao encontrado por outros trabalhos, no entanto, vale ressaltar que o processo de fermentação não precisou da adição de indutores ou fonte de suplementação no meio, e isso torna-se algo importante para a indústria devido à redução de custos operacionais.

### **3.1.1 Composição físico-química do resíduo da cana**

A composição físico-química do resíduo da cana-de-açúcar in natura e fermentada (nas condições otimizadas) por *P. roqueforti* ATCC 10110 estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6-** Composição físico-química (% , g/100g de resíduo) do resíduo da cana in natura e após a fermentação em estado sólido por *P. roqueforti* no tempo ótimo estabelecido pelo modelo estatístico.

Nutrientes (%, g/100g de resíduo)	<i>Resíduo in natura</i>	<i>Resíduo fermentado</i>
Fibra em detergente neutro (FDN)	67,03 ±1	30,93 ±1
Fibra em detergente ácido (FDA)	60,41 ±1	27,44 ±1
Lignina (LIG.)	50,50 ±1	24,24 ±1
Celulose (CEL)	9,88 ±1	3,18 ±1
Hemicelulose (HC)	6,63 ±1	3,49 ±1
Matéria seca (MS)	91,88 ±1	39,82 ±1
Proteína (PB)	1,59 ±1	1,01 ±1

Fonte: dados da pesquisa

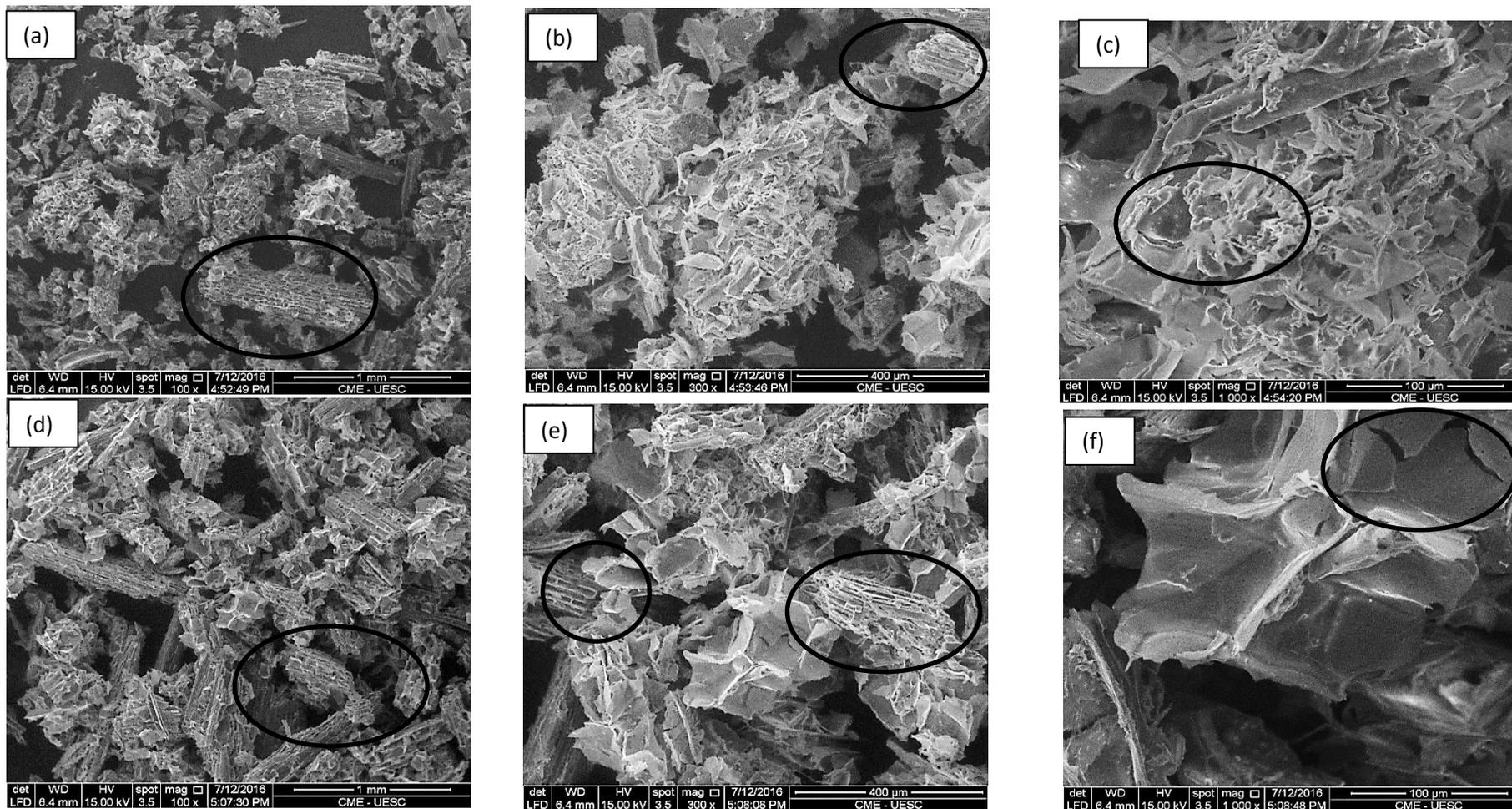
Com base na composição físico-química do resíduo da cana fermentada por *P. roqueforti*, observa-se que o teor proteico foi 36,47% menor que a condição do resíduo in natura, indicando a degradação de parte dos aminoácido durante o processo fermentativo, além disso, os teores fibrosos (FDN, FDA e LIG) também decaíram durante a fermentação, assim a degradação de nutrientes demonstra afinidade do fungo pelo substrato.

Os valores de FDN encontrados no resíduo in natura neste estudo foram semelhantes ao encontrados por Carvalho et al. (2006) que estudaram valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amenizado com quatro doses de ureia, e cujos valores de FDN foram em torno de 64%, com o uso de 5,0% de ureia. No entanto, os valores de FDN encontrados por esses autores foram superiores comparados com o encontrado no resíduo da cana fermentada em estudo. Os teores de FDA do resíduos in natura (60,41%), foram semelhantes aos encontrados por Geron et al. (2010), ao avaliar a composição química, valor de pH e temperatura do mesmo resíduo nas formas in natura e hidrolisado com Ca(OH)<sub>2</sub>, atingindo o percentual de 59,99%.

### 3.2 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar in natura e fermentada por *P. roqueforti*.

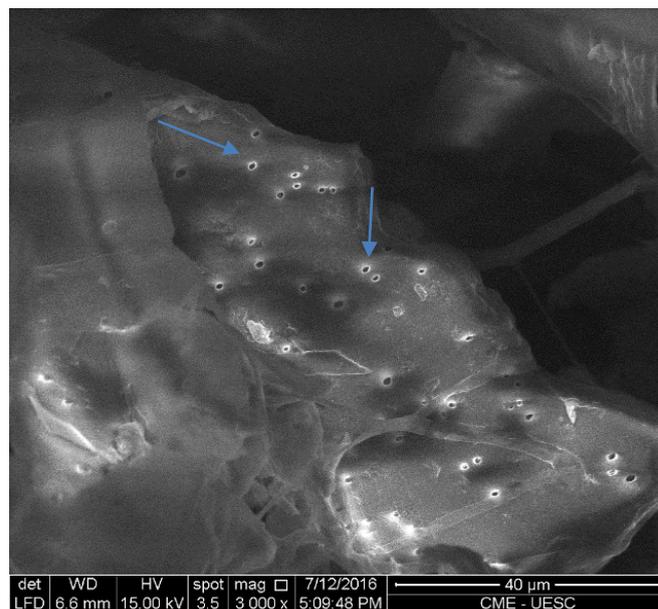
As micrografia obtidas por MEV para as partículas do bagaço de cana-de-açúcar in natura e biomassa fermentada são apresentadas na Figura 3.

**Figura 3** –Micrografias do: (a, (b) e (c) - Bagaço da cana-de-açúcar in natura (100x -300 e 1000x); d) e) e f) -Bagaço fermentado por *P. roqueforti* ATCC 10110 (100-300 e 1000x). São destacadas a ação do fungo sobre o resíduo.



Como se pode observar, a estrutura morfológica da superfície do bagaço da cana-de-açúcar in natura (fig. 3.a-c) em diferentes aumentos, é possível notar uma superfície compacta, sem a ação do fungo, e com uma preservação da superfície externa do bagaço da cana. No entanto, quando submetidas a FES por *P. roqueforti* ATCC 10110 as fibras e outros componentes presentes na parede celular são desestruturados, como observado em destaque nas figuras 3. (d-f). Essa modificação da camada externa do resíduo, tornado mais visíveis os filamentos fibrosos, devido a ação dos fungos na procura de nutrientes para o seu desenvolvimento, causando modificações superficiais da matéria. A medida que o fungo consome os micronutrientes presente no bagaço, os danos causados na fibra vão se intensificando e algumas placas são rompidas mudando a morfologia estrutural, como destacado na Figuras 3. (f). No entanto, pode observar na Figura 4, micrografia do resíduo fermentado na magnitude de 3000x, mostrado a presença dos fungos sobre superfície externa do resíduo.

**Figura 410-** Micrografias por MEV a 3000x de uma partícula do bagaço da cana-de-açúcar fermentada por *P. roqueforti* ATCC 10110, destacando a ação do fungo sobre o resíduo



Fonte: dados da pesquisa

#### 4 CONCLUSÃO

Durante o processo fermentativo o fungo sintetizou e excretou as xilanases sem a necessidade qualquer outro indutor além do bagaço da cana-de-açúcar, assim demonstrou o grande potencial do fungo no processo de fermentação em estado sólido. Portanto, as xilanases produzidas por *P. roqueforti*, podem ser aplicadas na forma putrificada ou extrato bruto na indústria de óleo essencial, com o intuito de melhorar a eficiência e rendimento do processo.

Contudo, a fermentação é uma alternativa promissora para a diminuição dos impactos ambientais causado pelo descarte inadequado dos resíduos agroindústrias, pelo fato de serem utilizados no processo de biotransformação para produção de metabolitos secundários, como por exemplos, as enzimas.

### **CAPÍTULO 3** - Xilanase produzido por *Penicillium roqueforti* por meio da fermentação em estado sólido a partir do bagaço da cana-de-açúcar: caracterização e purificação parcial.

#### **RESUMO**

As enzimas são biocatalisadores de grande valor industrial devido a sua ampla faixa de aplicação e seu alto grau de especificidade. Essas características particulares das enzimas influenciam sobre a eficiência e rendimento dos processos nos quais estão inseridas. Outro fator importante é conhecer o comportamento das enzimas sobre as variadas condições de pH, temperatura, congelamento e armazenamento, para que seja selecionada uma enzima compatível com as etapas de processamento. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar as xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 pela fermentação em estado sólido, cujos os resultados preliminares indicaram que a enzima tem grande tolerância a exposição ao pH na faixa de 3,0 – 6,0, no entanto, apresenta baixa estabilidade no pH 7,0 e pH 8,0, obtendo zero de atividade após 4h de análise. As xilanases se mantiveram estáveis em diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80°C) com atividade relativa superior a 50%. Em comparação à xilanase comercial (Sigma<sup>®</sup>), a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentou um comportamento semelhante sobre as mesmas condições de análise, sendo que em determinados momentos apresentou melhor desempenho. Para a estabilidade ao congelamento a -20 °C, as xilanases não sofreram desativação considerável, O valor de  $K_M$ , usando a xilana *beechwood* como substrato, foi de 84,14 mg/mL para as xilanases presente no extrato enzimático bruto é 6,52 mg/mL para a xilanase comercial (Sigma<sup>®</sup>), cujo o valor de  $V_{máx}$  foi 188,67  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . para o extrato e 114,95  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . para a xilanase comercial (Sigma<sup>®</sup>). Assim é demonstrado a afinidade e velocidade da enzima pelo substrato xilana. A presença de íons sobre a xilanase provocou efeitos variados, pois na presença  $\text{CoCl}_2$  a atividade relativa de xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 aumentou em 91%, enquanto que para a xilanase comercial (Sigma<sup>®</sup>) resultou na queda da atividade enzimática. A purificação parcial do extrato enzimático bruto por sulfato de amônia, a 100% de saturação apresentou a melhor atividade (40,50 U/mg). Portanto, produção de xilanase a partir do bagaço de cana representa uma alternativa interessante para as industriais de processamento.

**Palavra-chave:** Biocatálise, reutilização, enzima

## ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts of great industrial value due to their wide range of application and their high degree of specificity. These particular characteristics of enzymes influence the efficiency and yield of the processes in which they are inserted. Another important factor is to know the behavior of the enzymes on the various conditions of pH, temperature, freezing and storage, so that an enzyme compatible with the processing steps is selected. Thus, the objective of this work was to characterize the xylanases produced by *P. roqueforti* ATCC 10110 by solid state fermentation, whose preliminary results indicated that the enzyme has a high tolerance to exposure to pH in the range of 3.0 - 6.0, However, it presents low stability at pH 7.0 and pH 8.0, obtaining zero activity after 4h of analysis. The xylanases were stable at different temperatures (50, 60, 70 and 80 ° C) with relative activity higher than 50%. Compared to commercial xylanase (Sigma®), *P. roqueforti* xylanase ATCC 10110 showed similar behavior on the same assay conductors, and at certain times showed better performance. For stability to freezing at -20 ° C, the xylanases did not undergo considerable deactivation. The KM value using the beechwood xylan as the substrate was 84.14 mg / mL for the xylanases present in the crude enzyme extract is 6.52 Mg / mL for commercial xylanase (Sigma®), whose Vmax value was 188.67 μmol / mL.min. For the extract and 114.95 μmol / mL.min. For commercial xylanase (Sigma®). Thus the affinity and speed of the enzyme is demonstrated by the xylan substrate. The presence of ions on xylanase caused varied feats, because in the CoCl<sub>2</sub> presence the relative activity of *P. roqueforti* xylanase ATCC 10110 increased by 91%, whereas for commercial xylanase (Sigma ®) resulted in the decrease of enzymatic activity. Partial purification of crude enzyme extract by ammonium sulphate at 100% saturation showed the best activity (40.50 U / mg). Therefore, xylanase production from sugarcane bagasse represents an interesting alternative for industrial processing.

Key words: Biocatalysis, reuse, enzyme.

## 1 INTRODUÇÃO

No setor industrial, as enzimas são biocatalisadores extremamente importantes devido sua ampla faixa de aplicação, seletividade sobre diferentes substratos e alto grau de especificidade. Além disso, a aplicação de enzimas minimiza a utilização de catalizadores químicos e a liberação de substâncias poluentes e/ou tóxicas ao ambiente. Em virtude deste grande potencial, a produção de enzimas requer diferentes metodologias que possibilitem uma maior disponibilidade destas moléculas. Assim, a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes para a produção de enzimas em bioprocessos é prática cada vez mais explorada por ser tratar de processos de conversão de resíduos em produtos de alto valor comercial de forma ecológica e de baixo custo.

O conhecimento das características das enzimas produzidas é de vital importância, pois define as condições de sua aplicação. Conhecer a estabilidade ao pH, à temperatura e ao congelamento permite otimizar a aplicação de uma enzima de modo que ela persista por tempo suficiente para cumprir a função esperada. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização das xilanases produzidas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar, tais enzimas são utilizadas em indústria de sucos e bebidas para melhorar o processo de clarificação e rendimento do suco.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O microrganismo utilizado para os ensaios de fermentação foi o *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, o qual foi obtido da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Manguinhos, Rio de Janeiro, sob o no. 40075, lote 079840075. Este fungo foi inoculado em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubado em estufa BOD com temperatura controlada de 25 °C por 7 dias ou até esporulação abundante (observado visivelmente devido a coloração verde). A cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa em solução Tween 80 (0,01%, v/v), ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer e microscópio binocular (L1000; Bioval). O resíduo empregado como substrato

de cultivo para o fungo foi bagaço de cana-de-açúcar obtido na cidade de Itapetinga (Bahia), este resíduo foi lavado, seco em estufa com circulação forçada de ar por 24 horas a 65°C. Após a secagem, o resíduo foi triturado em triturador tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) para a obtenção de partículas com 2 mm. O material assim obtido foi denominado resíduo da cana, armazenados em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento de serem utilizados. Para as fermentações, 5 g de bagaço foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 15 minutos em Erlenmeyers visando não só sua esterilização mas também seu pré-tratamento térmico. A inoculação do substrato foi feita a  $10^7$  esporos/g de substrato (TUNG et al., 2004) e as fermentações foram realizadas sob as condições otimizadas definidas em trabalho prévio (dados não publicados): 92 h, 64% de umidade inicial e 23°C em estufas do tipo BOD (ACB LABOR).

### **2.1.1 Diferentes fontes de suplementação do resíduo**

No ponto ótimo de fermentação do bagaço da cana-de-açúcar foi avaliado o efeito do sulfato de amônia 2,5% (m/m), glicose 2,5% (m/m), xilose 2,5% (m/m), sacarose 2,5% (m/m) e extrato de levedura 2,5% (m/m). As respostas foram expressas como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 17,80 UI/g.

## **2.2 Obtenção do extrato enzimático bruto**

Após a etapa de fermentação, foram adicionados, para cada 1 g de substrato fermentado, 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8), a mistura foi mantida em agitação por 20 min a 170 rpm e 35 °C sendo em seguida prensada (prensa mecânica) através de gaze, para separar os sólidos do filtrado que foi coletado em tubo Falcon e centrifugado a 3000 rpm por 10 min. A parte sobrenadante foi coletada e utilizada para os ensaios enzimáticos, sendo este extrato denominado de extrato enzimático bruto.

### **2.2.1 Extração com diferentes tipos de tampões**

Após a etapa de fermentação, foram adicionados aos meios fermentados 10 mL de tampão para cada 1 g de resíduo. Foram utilizados os tampões Tris - HCL (0.066 mol/L, pH 8.0), acetato-fosfato (0.1 mol/L, pH 7.0), fosfato de sódio (0.05 mol/L, pH 7.0), fosfato de sódio (0.01 mol/L, pH 7.0) e água destilada. As misturas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Shaker) por 20 minutos a 170 rpm e 35°C. O conteúdo inteiro de cada frasco foi prensado (prensa mecânica) através de gaze, para separar o sólido do extrato enzimático,

e o filtrado foi coletado em tubo Falcon e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A parte sobrenadante foi coletada e utilizada para os ensaios enzimáticos. A atividade de xilanase foi determinada em triplicata e o resultado expresso como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo o resultado do tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8) foi de 17,80, considerado como 100%.

### **2.2.2 Determinação da temperatura ótima de reação**

Foi determinada a temperatura ótima para a atividade de xilanase obtida a partir do extrato enzimático bruto e para o preparo comercial de xilanase de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma<sup>®</sup>) para fins de compreensão. Foram analisadas as temperaturas de 40 a 90 °C durante 10 min. As respostas foram expressas como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 23,33UI/g para o extrato bruto, e ( $U_0$ ) de 238,20 UI/g para xilanase comercial.

### **2.2.3 Determinação da estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da xilanase foi avaliada incubando-se um tubo falcon, 10 ml do extrato enzimático bruto em banho-maria sob diferentes temperaturas (de 50 a 80°C) durante 5 horas em banho Maria. Para cada temperatura de ensaio foi retirada uma alíquotas de 1,0 mL em intervalos de 1 h e a atividade de xilanase foi determinada. As respostas foram expressas como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 19,95 UI/g. Para efeito de comparação foi realizado o mesmo procedimento com uma solução de xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma<sup>®</sup>) na concentração inicial ( $U_0$ ) de 109,92 UI/g. Os valores de meia vida ( $t_{1/2} = \ln(0,5) / kd$ ) em diferentes temperaturas foram estimados por meios de curvas que correlacionam a porcentagem de atividade residual e o tempo de incubação.

### **2.2.4 Determinação do pH ótimo**

Para a determinação do pH ótimo para a atividade de xilanase foram utilizados tubos de ensaio contendo 1 mL do extrato enzimático bruto e 1 mL de tampão no pH desejado, em seguida, os tubos foram incubados a 50 °C por 10 min. Com o termino do tempo, a atividade de xilanase foi determinada em triplicata e o resultado expresso como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo o resultado de 18,01 UI/g considerado como 100%. Para efeito de comparação foi realizado o mesmo procedimento com uma solução de xilanase comercial

de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma<sup>®</sup>) na concentração inicial ( $U_0$ ) de 200,38 UI/g.

### **2.2.5 Determinação da estabilidade em diferentes valores de pH**

A estabilidade do extrato enzimático bruto a diferentes valores de pH foi avaliada em pH 3,0 a 8,0. A amostra contendo o 1 mL do extrato enzimático bruto foi misturado com 1 mL de tampão no pH desejado, em tubo de ensaio. O tampão citrato de sódio (0,05 M) foi utilizado para a faixa de pH de 3,0 a 5,0 e o tampão fosfato de sódio (0,05 M) para a faixa de pH de 6,0 a 8,0. A incubação dos tubos foi feita em banho-maria a 50°C por 5 horas e nos intervalos de 1 h foi retirado um tubo e determinada em triplicata a atividade de xilanase. As respostas foram expressas como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 19,95 UI/g. Foi realizado o mesmo procedimento com uma solução de xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma<sup>®</sup>) na concentração inicial 1% (m/v).

### **2.2.6 Estabilidade da biomassa ao congelamento**

A biomassa fermentada (bagaço + células) foi congelada e mantida em congelamento à -20°C por 150 dias e a cada 30 dias foi retirada uma amostra de 5,0 g e feita a suspensão em 50 mL de tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8) e incubados a 35 °C por 10 min e 170 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo foi centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. A dosagem da atividade de xilanase foi realizada no sobrenadante obtido. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) 19,02 UI/g, que corresponde a atividade obtida antes do congelamento.

### **2.2.7 Estabilidade ao congelamento do extrato enzimático bruto**

A estabilidade da atividade de xilanase congelada -20°C por 100 dias também foi avaliada e a cada 10 dias foi retirado do freezer um eppendorf contendo 2 mL do extrato enzimático bruto e feita a dosagem da atividade de xilanase. As respostas foram expressas como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 21,10 UI/g.

### **2.2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{máx}$ )**

Os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis Mentem ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) foram determinados pela regressão de Lineweaver-Burke (1934) para o extrato enzimático bruto e

para uma solução de xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) na concentração de 0,1% (m/v). Com base na metodologia utilizado para a determinação da atividade de xilanase, variou-se a concentração de xilana entre 1 e 20 mg/mL. A atividade de xilanase inicial empregada foi de 2,01 UI/g.

### **2.2.9 Concentração por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$**

O extrato enzimático bruto foi centrifugado a 3.000 rpm para a retirada de impurezas, em seguida, foram adicionadas lentamente quantidades de sulfato de amônia de forma a se obter concentrações de: 20, 40, 60 e 80, 100% (g/100 mL). Nos ensaios que se seguiram, cada fracionamento foi mantido em repouso por 1 hora, em seguida a amostra foi centrifugada a 15.000g por 20 min a 4°C. Com a formação de precipitado, o mesmo foi retirado e ressuspendido em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8). Os resultados foram expressos como atividade específica em que a atividade de xilanase é expressa por mg de proteína total do extrato (U/g.mg).

### **2.2.10 Efeito da adição de diferentes compostos**

O efeito de íons metálicos sobre a atividade de xilanase presente no extrato enzimático bruto e em um preparado de xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) na concentração inicial ( $U_0$ ) de 124,90 UI/g, foi avaliado por meio da adição de sais metálicos (2 mmol/l) ao meio de reação padrão para determinação da atividade de xilanase: EDTA, Trolox, Triton, SDS acetato de chumbo ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), acetato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), cloreto de cobalto II ( $\text{CoCl}_2$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), acetato de zinco ( $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ), sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4$ ). A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa  $[(U/U_0)100\%]$ , sendo a atividade de partida ( $U_0$ ) de 23,33UI/g pra o extrato bruto considerada como 100% da atividade de xilanase sem os inibidores.

## **2.3 Determinação da atividade de xilanase**

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos com base em procedimentos padrão recomendados pela comissão sobre Biotecnologia, IUPAC (GHOSE e BISARIA, 1987). A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de 1 mL de xilana de “beechwood” (Sigma), na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8), com 1 mL do extrato

enzimático bruto (previamente diluído (10 vezes)) em banho-maria a 50 °C por 10 minutos. Para o controle da reação foram incubados 1 mL de tampão citrato de sódio com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído), enquanto que o branco de reação consistiu de 1 mL de tampão citrato de sódio e 1 mL da solução de xilana. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método de Miller (1959), adicionando-se 2 mL de reagente DNS a 1 ml do meio de reação, seguido de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e convertida em atividade enzimática a partir de uma curva padrão de xilose.

Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto, a 50 °C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g).

### **2.3.1 Determinação da proteína total**

A dosagem de proteína contido no extrato enzimático bruto e concentrado foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão a 595 nm em espectrofotômetro.

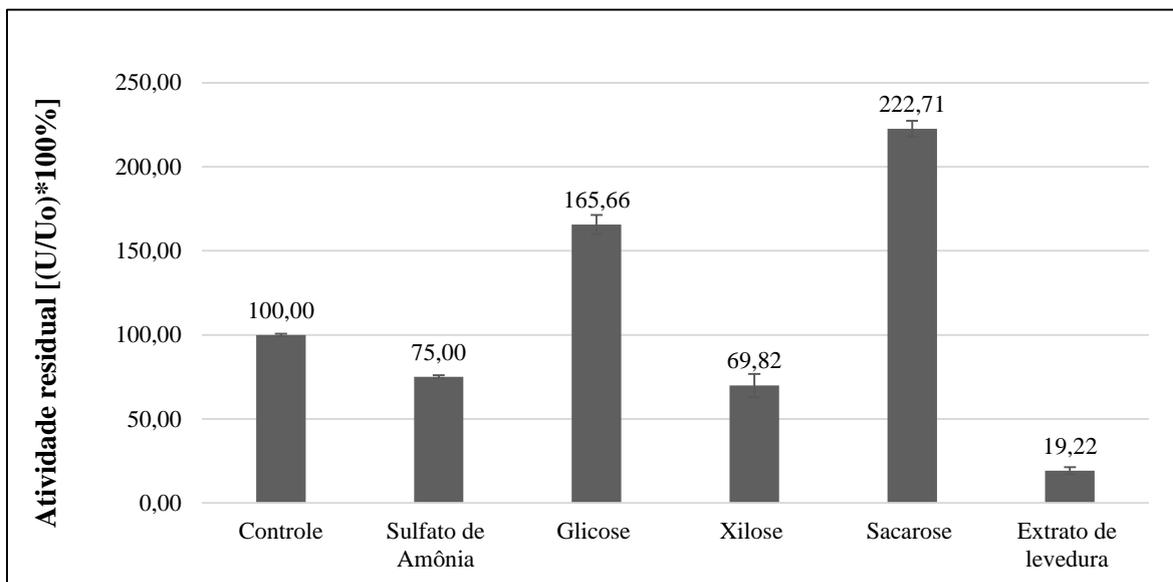
## **3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização do extrato enzimático bruto**

#### **3.1.1 Efeito de diferentes fontes de suplementação**

No intuito de obter melhores produções de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110, a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram adicionadas ao bagaço de cana-de-açúcar antes da inoculação. As atividades de xilanase obtidas foram expressas em relação à sua condição sem suplementação e os resultados podem ser observados na Figura 1.

**Figura 111-** Atividades relativas de diferentes fontes de suplementação na produção das xilanases por *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana em FES.



\* A atividade de xilanase controle ( $U_o$ ) em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH = 4,8) foi de 17,80 UI/g. As barras representam o desvio das triplicatas realizadas. Fonte: dados da pesquisa

De acordo com os resultados obtidos (Figura 1), as maiores atividades de xilanase foram obtidas utilizando os açúcares sacarose e glicose, sugerindo uma preferência nutricional pela glicose que é um monossacarídeo de fácil metabolismo e bom rendimento energético. Com as outras fontes de suplementação analisadas também houve produção da xilanase, mesmo que em quantidades menores, o que pode ser um reflexo da preferência nutricional do fungo ou das condições de fermentação para estes tipos de substratos.

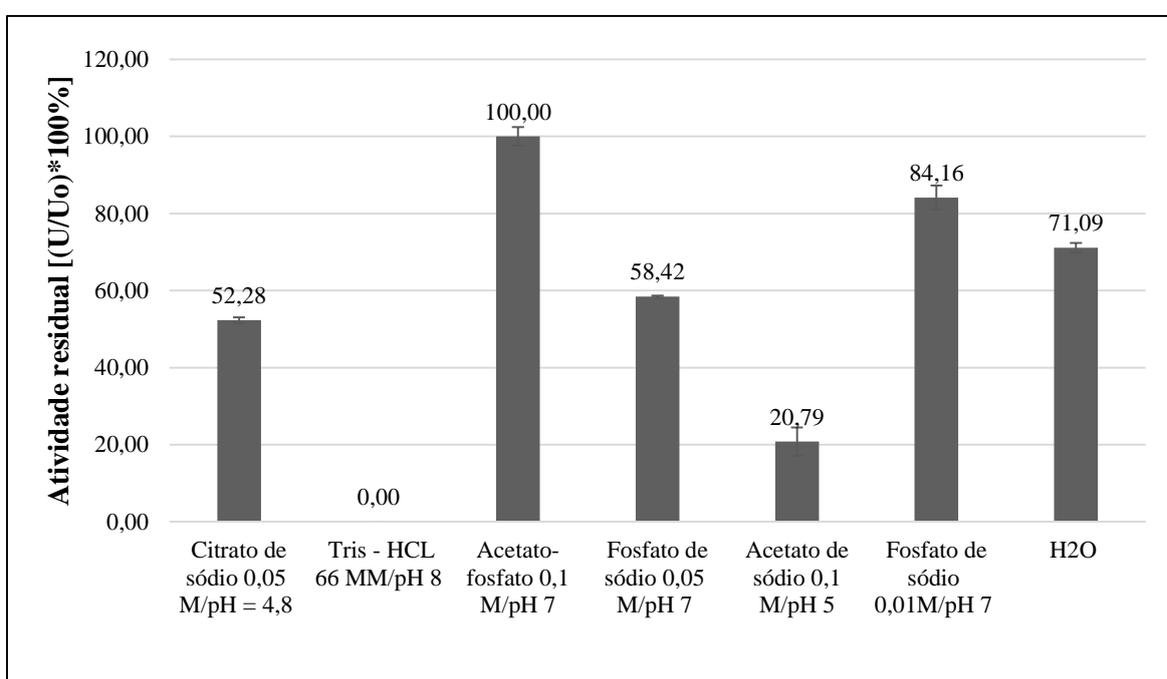
Bons resultados de suplementação dos resíduos agroindustriais foram relatados por outros autores como Silva e Thomeo (2016) que estudaram o efeito da variação peptona, sulfato de amônia e peptona/sulfato de amônia sobre a produção xilanase por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, obtendo uma menor resposta de atividade enzimática utilizando o sulfato de amônia como indutor, Thomas et al. (2016) avaliaram o efeito de diferentes fontes de indutores para a produção de xilanase extracelular por uma estirpe isolada de *Aspergillus* sp., verificou-se que a produção de xilanase chegou a 5059 UI/g utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono o (extrato de levedura) como fonte de nitrogênio. Sanjivkumar et al. (2016) avaliaram as propriedades xilanolíticas de um actinobactério *Olivaceous Streptomyces* (MSU3) isolado da amostra de sedimento do ambiente de mangue, e obtiveram melhores atividades utilizando fontes de nutrientes como a sacarose (2%) com atividade máxima de 202,47 IU/ml e extrato de levedura (3%). Com atividade máxima de

170,42 IU/ml.

### 3.1.2 Efeito de diferentes tampões de extração

A obtenção do extrato enzimático bruto após a fermentação foi avaliada com diferentes tampões e a atividade de xilanase obtida em cada caso foi expressa em relação à condição controle com tampão citrato de sódio (0,05 M / pH = 4,8), os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.

**Figura 212**– Atividades relativas para diferentes tampões empregados na extração de xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar.



\*A atividade de xilanase controle (U<sub>0</sub>) em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH = 4,8) foi de 17,80 UI/g. Fonte: dados da pesquisa

Como pode-se observar na Figura 2, a atividade enzimática da xilanase de *P. roquefort* ATCC 10110 extraída com os tampões acetato-fosfato (0,1 M/pH = 7,0), fosfato de sódio (0,05 M/pH = 7,0), fosfato de sódio (0,01 M/pH = 7,0) e H<sub>2</sub>O foram 20% maiores em relação ao controle, possivelmente devido às baixas concentrações molares. No entanto, a utilização do tampão Tris - HCl (0,66 mol/L/pH = 8,0) inativou a enzima, o que pode ter sido causado pela desnaturação promovida pelo ácido clorídrico.

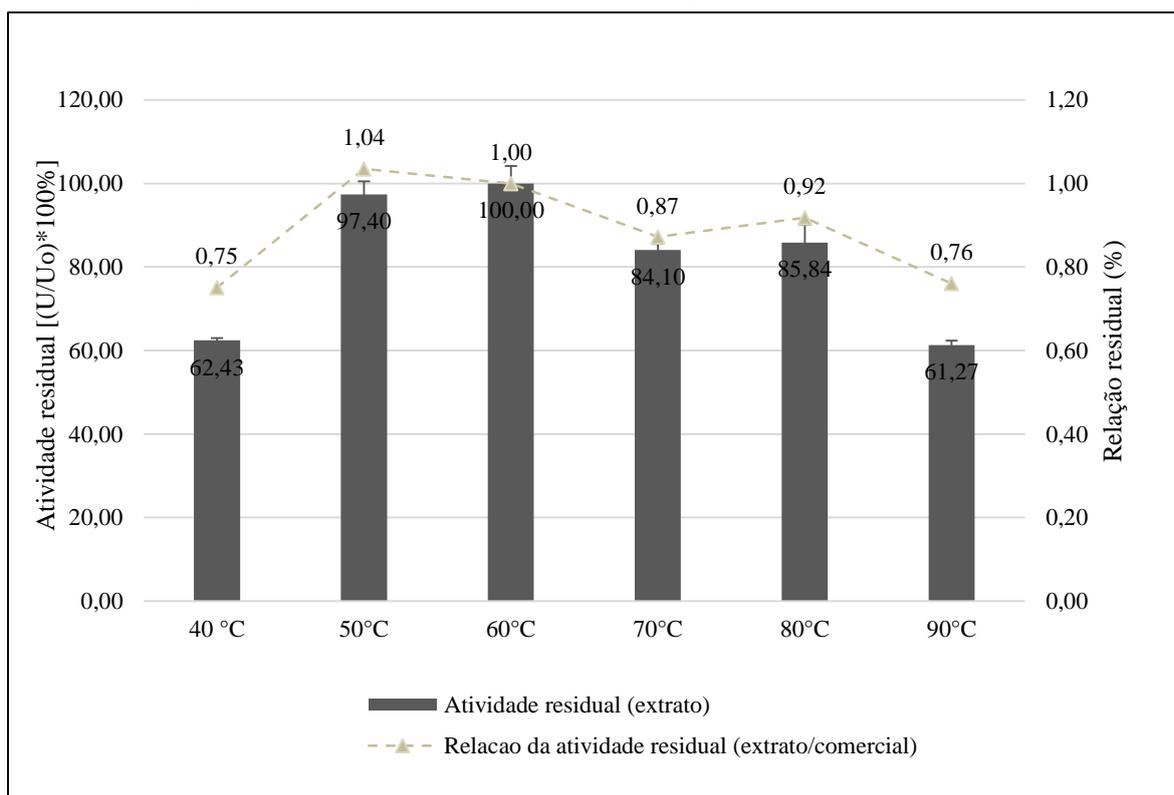
Nos estudos de Gowdhaman et al. (2014) foi avaliado a produção de xilanase de *Bacillus aerophilus* KGJ2 e sua aplicação na preparação de xilolossacarídeos, e para a extração da enzima foi utilizado o tampão fosfato (0,1 mol/L /pH = 7,0). De acordo os autores estudos foi o tampão que apresentou melhores resultado, com atividade xilanolitica de 45.9

U/g. No entanto, Saha et al (2014) utilizou o tampão citrato ( 0,1 mol/L/pH = 5,4) na extração de xilanase por *Penicillium citrinum* XYM2 com atividade máxima de 2834 IU/ml. Portanto, os tipos de tampões em diferentes faixas de pH exercem comportamentos distintos sobre a atividade inicial da enzima a ser extraída, assim pode ser observado uma influência positiva e negativa como o caso do Tris-HCL em estudo.

### 3.1.3 Efeito da temperatura

A temperatura ótima para a atividade da xilanase no extrato bruto produzido por *P. roqueforti* foi determinada em tampão citrato de sódio (0,05 M/pH = 4,8) em diferentes temperaturas e as atividades obtidas foram expressas em relação à condição controle e também em relação ao desempenho demonstrado por uma xilanase comercial; os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.

**Figura 3-** Efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase presente no extrato enzimático bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana.



\*As colunas escuras representam as atividades residuais a partir de uma solução contendo U<sub>0</sub> = 23,33 UI/g. As colunas claras representam a relação entre as atividades residuais da xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 e as atividades residuais de uma xilanase comercial sob as mesmas condições e com atividade inicial (U<sub>0</sub>) de 238,20 UI/g. Fonte: dados da pesquisa

Pode-se observar (Figura 3, colunas escuras) que a xilanase presente no extrato enzimático bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentou reação na faixa de temperatura

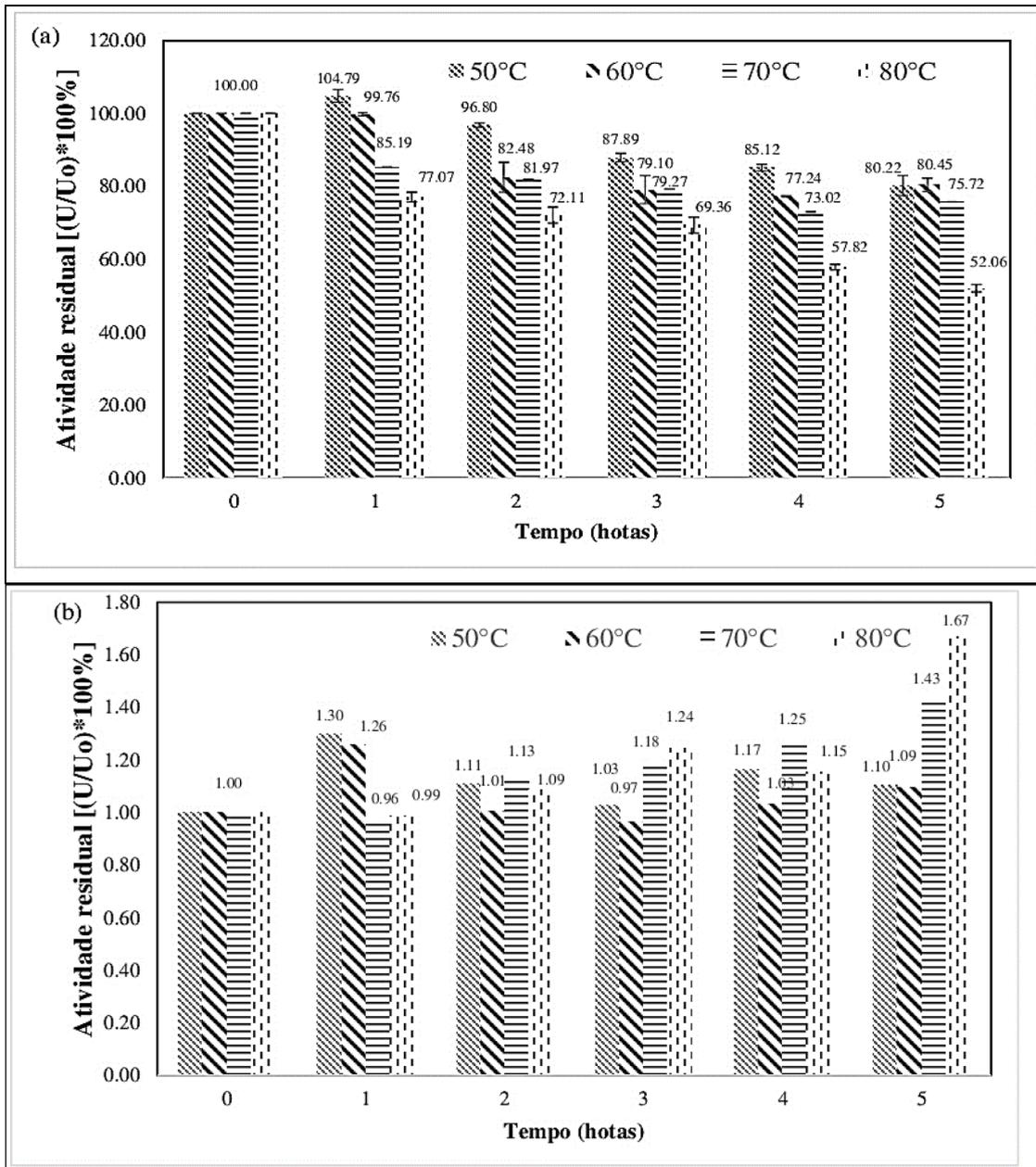
entre 40 e 90 °C; no entanto, as melhores atividades residuais (> 90%) foram observadas nas temperaturas de 50 e 60 °C. Nos extremos de temperatura analisados, 40 e 90°C, foram observadas atividades residuais em torno de 14,57 UI/g e 14,30UI/g. Em comparação com a xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (Figura 3, gráfico linha) os resultados foram próximos, especialmente nas temperaturas entre 50 e 70 °C, sendo que nos extremos de temperatura o desempenho foi 25% menor. No entanto, por ser apenas um extrato bruto contendo não apenas a xilanase, mas outros grupos enzimáticos, esses grupos de enzimas podem se arranjar numa conformação mais produtiva, formando uma barreira e tornando mais estável a variação térmica, algo promissor para a aplicação industrial.

Na literatura, foram encontrados resultados semelhantes ao obtidos neste trabalho, como os de Kulkarni, et al. (1999), em que a temperatura ótima para endoxilanses de origem fúngica e bacteriana variaram entre 40-60 °C, condizendo com os valores encontrados para a xilanase de *P. roqueforti* ATCC10110. Um valor de temperatura ótimo semelhante (~60°C) foi relatado por Zheng et al. (2014), para xilanases de *Paenibacillus* sp. NF1 cultivado em farelo de milho e extrato de jaca, por Maitan-Alfenas et al. (2016) trabalhando com *Aspergillus nidulans* em farinha de trigo e também por Chanwicha et al. (2014) para xilanase de *Thermoascus aurantiacus* var. levisporus KKU-PN-I2-1 purificada.

#### **3.1.4 Estabilidade térmica**

A temperatura é um fator de grande influência sobre o comportamento de uma enzima, principalmente em função do tempo. Assim, a estabilidade térmica da xilanase presente no extrato enzimático bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi determinada em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH = 4,8) em temperaturas de 50 a 80 °C por 5 horas. As atividades das xilanases obtidas foram expressas como atividades residuais e foram também relacionadas às atividades residuais de uma xilanase comercial, conforme apresentado na Figura 4.

**Figura 413** - (a) Termoestabilidade da xilanase (em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8) de *P. roqueforti* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas. As atividades foram expressas como atividades relativas em comparação com a condição de partida contendo 19,95U/g e b) em relação à atividade relativa apresentada por uma xilanase comercial (Sigma®) com atividade inicial de 109,92 UI/g.



Fonte: dados da pesquisa

Os resultados apresentados na Figura 4.(a) mostram que a estabilidade da xilanase presente no extrato enzimático bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 a 50 °C foi o melhor valor encontrado nos primeiros minutos de análise. No entanto, foi notado uma acentuada perda de atividade enzimática entre todas as faixas de temperatura com o decorrer do tempo, o que pode ser explicado pelo excesso de energia interna que resultou em um desdobramento negativo sobre o sítio ativo da enzima, levando a sua desnaturação e perda de atividade.

O tempo de meia-vida da xilanase a 50 °C é aproximadamente de 13,30h, uma característica interessante. A medida em que a temperatura aumenta a um decréscimo do tempo de ativação das enzimas, assim, a meia-vida a 80°C foi de aproximadamente 5,82h, correspondendo a tempo menor em relação às demais temperaturas (60°C ( $t_{1/2}=12,79$  h), 70°C ( $t_{1/2}= 12,86$ h)), no entanto, por ser em uma temperatura branda a enzima apresentou-se estável, o que é importante para sua aplicação industrial.

Um fator positivo da xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110, é que mesmo sobre forte influência da temperatura, esta permaneceu ativa durante 5 h, e a perda de atividade foi inferior a 50%, na temperatura mais branda. Comparando-se com a xilanase comercial (Sigma®) (fig. 3(b)), a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 sob temperaturas de 50 °C e 60 °C, durante 5 horas o rendimento foi 9% superior à xilanase comercial, e nas temperaturas de 70 °C e 80 °C o rendimento foi aproximadamente 67% superior. Esse comportamento pode ser devido ao fato do extrato multienzimático conter outros tipos de enzimas, além da enzima de interesse, e esses grupos enzimáticos podem estar atuando como barreira ao sítio ativo da xilanase, prevenindo sua desnaturação.

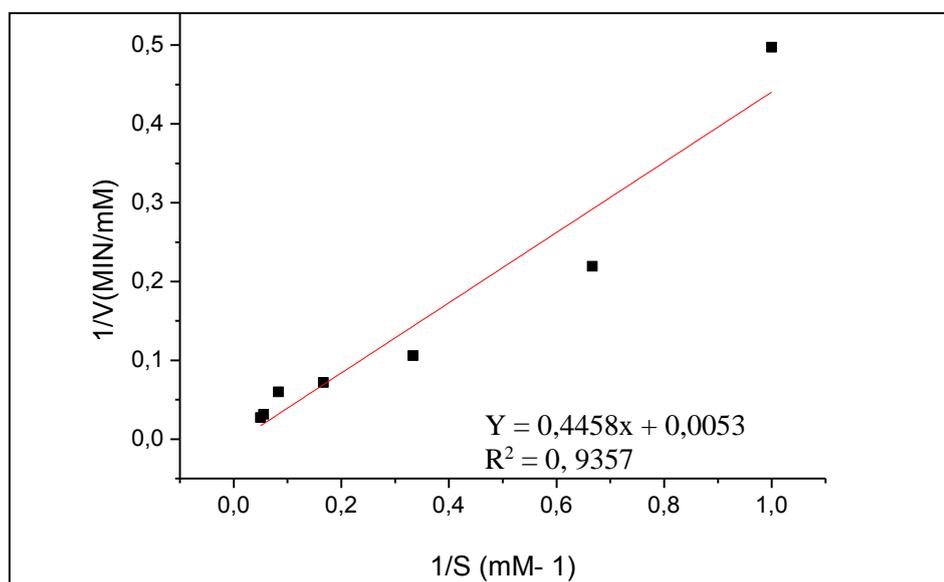
Deste modo, podemos dizer a temperatura é inversamente proporcional a atividade enzimática, devido ao aumento da temperaturas e a perda gradativa da atividade xilanolítica. Segundo Bruins, et al. (2001), as xilanases comerciais Pulpzyme® e Cartazyme® não apresentam grande estabilidade térmica, sendo que as atividades ótimas encontram-se na faixa de 50–60 °C, e a atividade enzimática se mantém a 50 % por 15 min a 55 °C, condizendo com o melhor valor de temperatura encontrado neste estudo.

Inúmeros trabalhos têm relatado a produção de xilanases alcalinas e termoestáveis por organismos termófilos e hipertermófilos, procariotos e eucariotos. Nos estudos de Cordeiro et al. (2002) com *Bacillus ssp.* A enzima permaneceu 100% ativa por 2 horas em temperaturas de 30°C a 50°C, a qual foi perdida em temperaturas superiores. Lemos et al. (2000), estudaram a estabilidade térmica de xilanase produzida por *Aspergillus awamori*, cujo os resultados mostram que as temperaturas de 30 a 40 °C durante 300 minutos e a 50 °C por 240 minutos. Nos estudos de Kronbauer et al. (2007), na produção de xilanase por *Aspergillus casielus*, a estabilidade térmica de xilanase na temperatura de 45°C mostrou-se praticamente constante, com perda de apenas 18% da atividade xilanolítica inicial em 90 minutos de reação. No entanto, nas temperaturas de 50°C e 55°C a enzima apresenta o tempo de meia vida de 50 e 17 minutos, respectivamente.

### 3.1.5 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{máx}$

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  para a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 foram estimados (Figura 5), respectivamente, em: 84,13 mg/ml e 188,67  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  e estes valores foram 87,25% ( $K_m$ ) maior e 64,15 % ( $V_{m\acute{a}x}$ ) maior que os parâmetros estimados para a xilanase comercial. O valor de  $K_m$  estimado neste presente trabalho foi ainda maior do que o valor observado por Beg et al. (2001) para a xilanase de fungos de *Thermomyces* DSM 5826 ( $K_m$  de 7,3 mg/ml), *Thermomyces lanuginosus*–SSBP ( $K_m$  de 3,26 mg/ml), *Trichoderma harzianum* ( $K_m$  de 4,88 mg/ml e por Camdra e Camdram (1996) com *Aspergillus fischeri* FXN1 (4,88 mg/ml). Já o valor estimado para  $V_{max}$  foi bem maior que o obtido por Carmona et al. (2005) com *Arpergillus versicolor* (5,8  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) e Querido et al. (2006) com *Penicillium expansum* (0,027  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ), foi semelhante ao obtido por Beg et al. (2000a) com *Streptomyces* sp QG-11-3 (158,85  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) porém inferior ao obtido por Silva (2006) com *Trichoderma* (2680,24  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ ) e por Sriprang et al. (2006) com *Aspergillus niger* (9556  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ).

**Figura 514**– Linearização de Linewaver-Burke para os dados cinéticos do extrato bruto contendo atividade de xilanase de *P. roqueforti* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. O substrato cinético foi xilana e a reação foi conduzida em tampão citrato de sódio (0,0 5 mol/L, pH 4,8) a 50°C a 10 min.



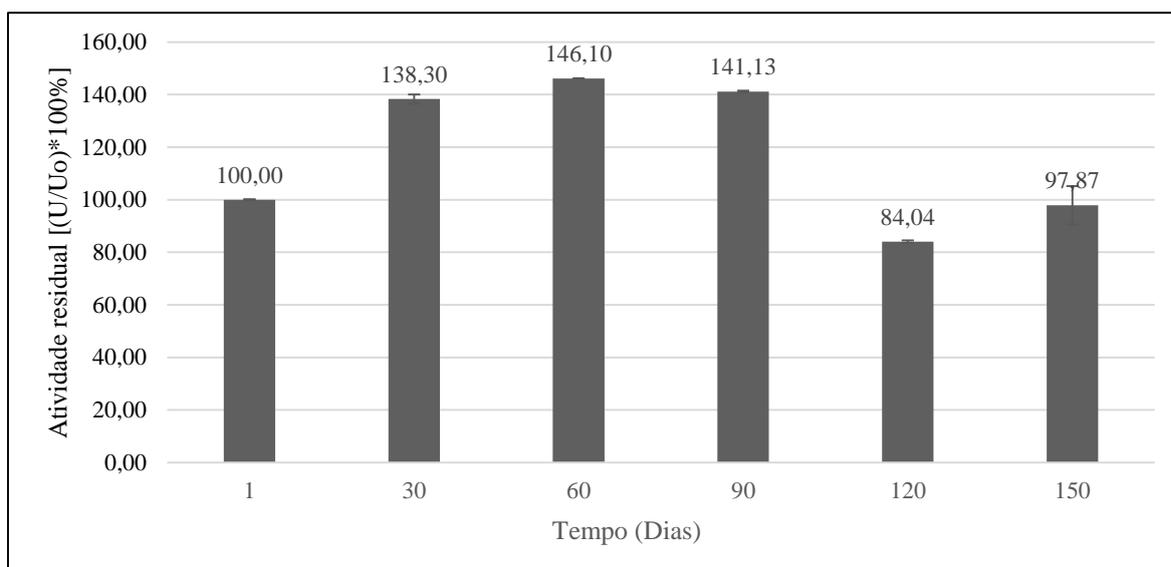
Fonte: dados da pesquisa

Segundo SEGEL (1979), quanto maior o valor de  $K_m$  menor a afinidade do substrato pela enzima, portanto, em comparação com a xilanase comercial a xilanase produzida por *P. roqueforti* apresentou menor desempenho, provavelmente devido a diferença de pureza dessas duas enzimas uma vez que neste trabalho o extrato não foi purificado.

### 3.1.6 Estabilidade da biomassa ao congelamento

A estabilidade da atividade de xilanase na biomassa fermentada estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi avaliada a 150 dias, e os valores de atividade residual obtidos são mostrados na Figura 6.

**Figura 6-** Atividades relativas da estabilidade da biomassa fermentada de cana-de-açúcar de *P. roqueforti* ATCC 10110 ao longo do tempo congelamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).



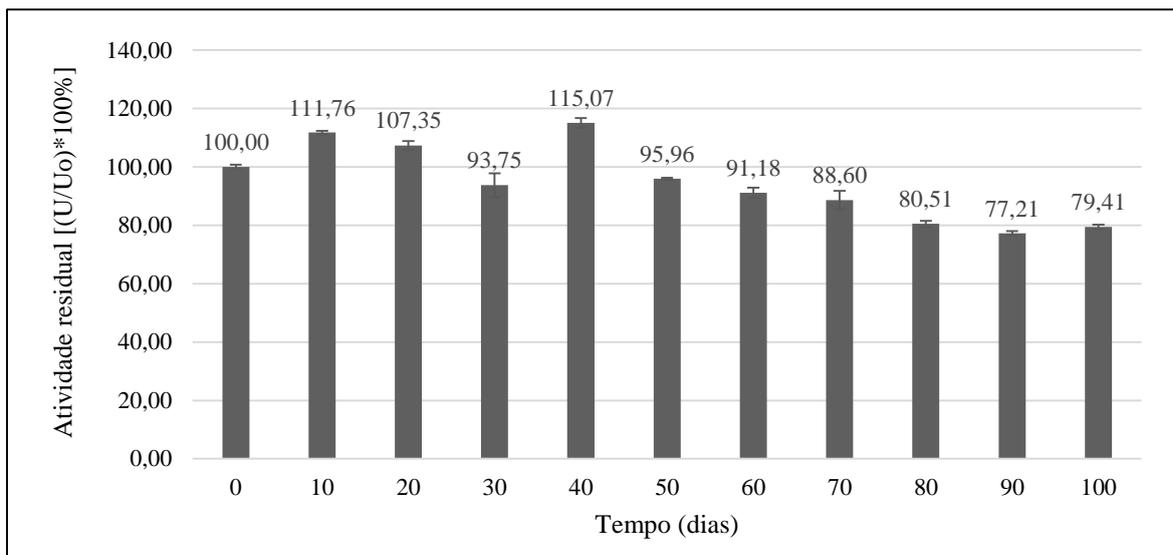
\* A atividade de xilanase controle ( $U_o$ ) em tampão citrato de sódio ( $0,05\text{ M}/\text{pH} = 4,8$ ) foi de  $19,80\text{ UI/g}$ . As barras representam o desvio das triplicatas realizadas. Fonte: dados da pesquisa

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a biomassa fermentada congelada apresentou um perfil de estabilidade positivo durante o início (até 60 dias) do estoque agindo, provavelmente, como uma proteção à enzima (figura 6). Uma máxima atividade notando que máxima atividade foi encontrada após 60 dias de armazenamento (aumento de  $46,10\%$  da atividade relativa em comparação ao controle (dia 1). Um decaimento discreto da atividade enzimática foi observada no período de 90 dias de estocagem no entanto, as xilanases aderidos a biomassa se mantiveram estáveis durante os 150 dias, o que representa uma característica promissora para aplicação industrial em função do longo período de armazenamento.

### 3.1.7 Estabilidade do extrato bruto ao congelamento

Foi avaliado a atividade das enzimas xilanolíticas ao longo do tempo de armazenamento na temperatura à  $-20^{\circ}\text{C}$  por 100 dias (figura 7). As atividades das xilanases, foram expressas em relação à sua condição inicial no primeiro dia de análise.

**Figura 715-** Atividades relativas da estabilidade do extrato bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 ao longo do tempo de estoque sob congelamento (-20°C).



\*A atividade de xilanase controle (U<sub>0</sub>) em tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH = 4,8) foi de 18,34 UI/g. As barras representam o desvio das triplicatas realizadas. Fonte: dados da pesquisa.

A desativação enzimática pode ocorrer pela influência de fatores como temperatura, pH, forças mecânica, ausência de substrato, entre outras. Na figura 7, observa-se que para o congelamento de xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110, a atividade relativa da enzima aumentou durante os 40 dias, o que pode ser devido ao desdobramento da proteína quando submetidos a baixas temperaturas e tornando-se tornado estáveis e aumentando o poder de ação após serem descongeladas. Segundo Aguiar e Lucena (2011), esse aumento da atividade enzimática pode ser explicada baseado no fato o congelamento afeta a estrutura original das proteínas, provocando reestruturação da cadeia polipeptídica, e quando são submetidas ao descongelamento as moléculas de enzimas poderão adquirir nova configuração com sítio ativo mais exposto, melhorando o poder de catalise e induzindo o aumento da atividade enzimática.

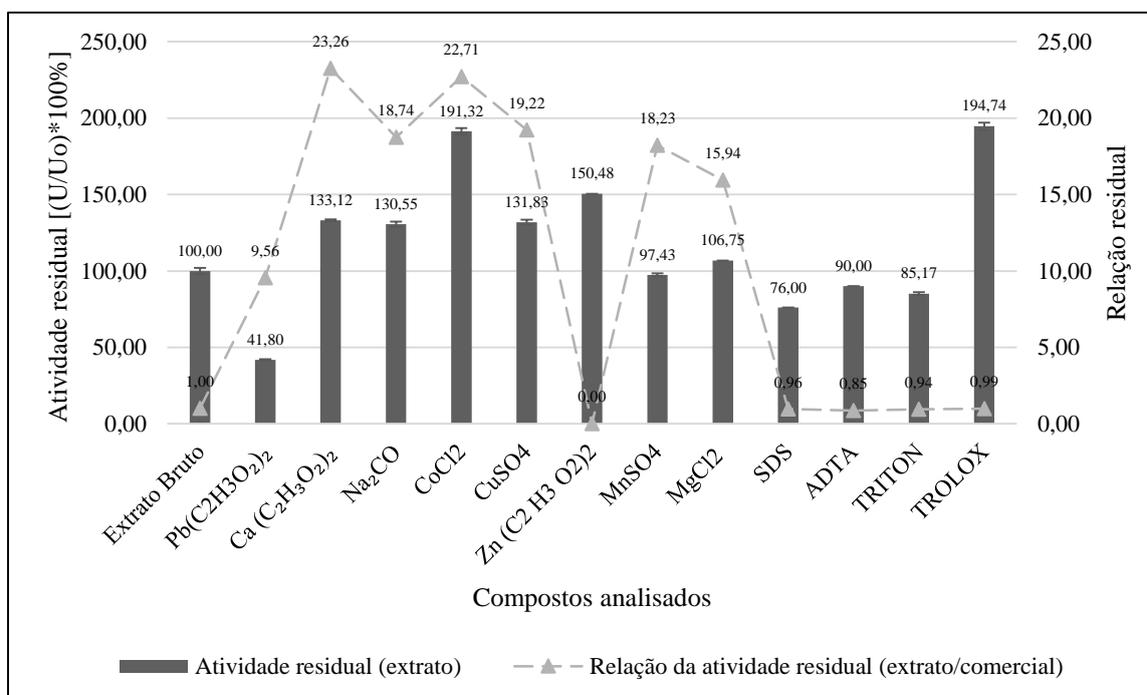
Após os 40 dias de estudo foi notado uma redução discreta da atividade enzimática, embora a atividade relativa tenha se mantido superior a 70% após 100 dias de armazenamento, o que demonstra a possibilidade de aplicação das enzimas em escala industrial.

### 3.1.8 Efeitos de íons metálico sobre as xilanases

A Figura 8 apresenta as atividades relativas obtidas para as xilanases de *P. roqueforti* ATCC 10110 e xilanase comercial após a adição de certos íons ao tampão de incubação

(citrato, 0,05 M / pH = 4,8).

**Figura 816-** Efeito da adição de íons, a 2 mmol/l, sobre a atividade da xilanase de *P. roqueforti* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar. A incubação foi conduzida em tampão citrato de sódio (0,05mol/L, pH = 4,8) e 50°C por 10 min. As colunas escuras representam a atividade residual em relação à condição inicial  $U_0 = 20,97$  UI/g. As colunas claras apresentam a razão entre as atividades relativas da xilanase de *P. roqueforti* e uma xilanase comercial sob as mesmas condições, na concentração de 1% (p/v) sendo sua condição inicial.



Fonte: dados da pesquisa

De acordo com os resultados na Figura 8, a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 (barras escuras) teve sua atividade aumentada (atividade relativa > 100%) na presença de:  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ ; enquanto que o no,  $Pb^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  causaram efeitos desestabilizadores na enzima, diminuindo a atividade relativa.

Segundo Dutta et al. (2007), o efeito ativador de alguns reagentes pode ser explicado devido a influência dos íons na conformação estrutural da enzima, ou pela interação de cátions com resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico. Assim, este tipo de interação pode ser uma modulação positiva, que aumenta a atividade enzimática ou uma modulação negativa, com redução da atividade da enzimática. Nos estudo de Hansoh e Nagieb (2004) para as xilanases de *Streptomyces galbus*, um dos o reagente estudado foi o  $Mn^{+2}$  que também apresentou efeito de inibição na atividade de xilanase, semelhante ao encontrado neste estudo. Guo et al. (2013), destacaram que o  $Mn^{+2}$  causou perda de mais de 54 % na atividade de xilanase produzida por *Glaciecola mesophila* KMM 241.

Em relação a xilanase comercial (Figura 8, colunas claras), os íons metálicos agiram com efeitos desestabilizadores sobre as proteínas, pois a presença do  $Zn^{+2}$  resultou na total

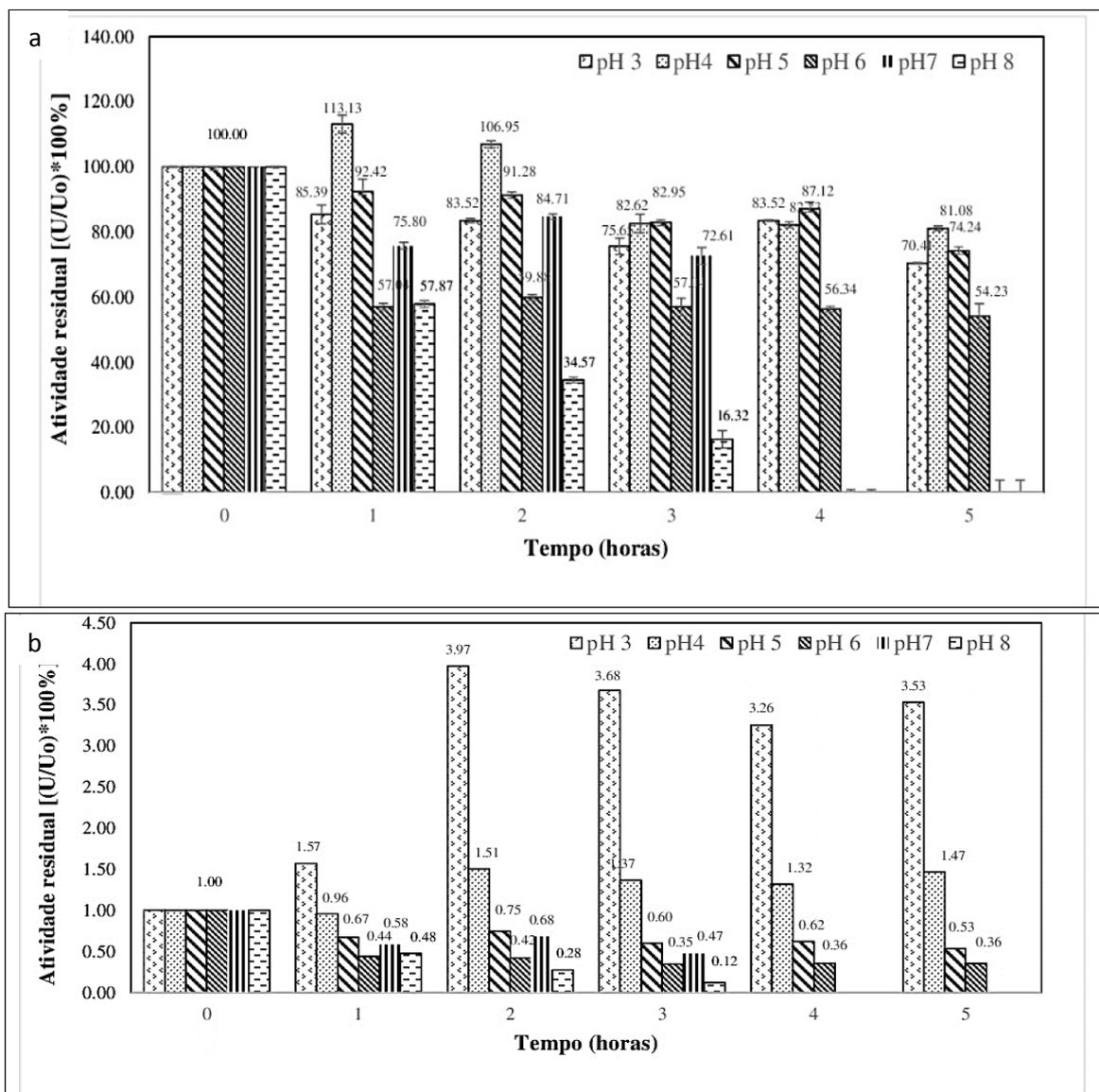
inativação da enzima. Por esse motivo, a xilanase de *P. roqueforti* presente no extrato bruto apresentou melhores desempenhos frente aos íons avaliados. Tal comportamento pode ser decorrente da presença de outras proteínas no extrato bruto, as quais agem como barreiras impedindo a desestabilização enzimática, uma vez que a xilanase comercial pura, de certa forma, está mais vulnerável a ação dos íons sobre a conformação estrutural dos resíduos de aminoácido.

As xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 incubadas na presença de SDS, EDTA e Triton apresentaram reduções de até 25% em suas atividades residuais (Figura 8, barra escura). No entanto, o Trolox exerceu uma influência positiva sobre o sítio catalítico da enzima, com o aumento de sua atividade em cerca de 95% em relação a atividade inicial. Em comparação com a xilanase comercial (Figura 8, colunas claras), a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentou desempenho similar, porem com o EDTA e Trolox foram obtidos resultados superiores. Segundo Nelson e Cox (2011), adição de SDS costuma inibir as enzimas por ser detergente e atuar sobre as regiões hidrofóbicas de proteínas, causando sua desnaturação.

### **3.1.9 Estabilidade a diferentes valores de pH**

A estabilidade da xilanase presente no extrato enzimático bruto de *P. roqueforti* ATCC 10110 ao pH, está representada na Figura 9, sendo as atividades expressas em relação à sua condição inicial e também em relação ao desempenho demonstrado por uma xilanase comercial (Sigma®).

**Figura 917-** (a) Barras representam a termoestabilidade da xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em bagaço de cana-de-açúcar para diferentes temperaturas. As atividades foram expressas como atividades relativas, (b) representam a relação à atividade relativa apresentada por uma xilanase comercial (Sigma®) com atividade inicial 109.92 UI/g.



Fonte: dados da pesquisa

As xilanases de *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentaram estabilidade em uma ampla faixa de pH, especificamente na faixa de pH de 3,0 a 5,0 (Figura 9a). Porém, os diferentes tampões usados para a determinação da estabilidade de xilanase, podem ter influenciado nos resultados, já que houve uma queda da atividade relativa acima do pH 6,0 que coincide com a troca de tampão. No entanto, a maior atividade relativa foi encontrada em valores de pH baixos, demonstrando a afinidade de xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 por condições ácidas.

A melhor atividade do extrato enzimático bruto foi obtida em pH 4,0 durante o

período de 1-2 horas, sendo a atividade residual mantida em torno de 90%. No pH 5 houve uma discreta queda da atividade, atingindo valor de 74% de atividade relativa em um período de 5 h. No entanto, no pH 6,0 a enzima se manteve estável no período 1-5 h, sofrendo uma queda de 46% de atividade após esse período. Nos valores de pH 7,0 e 8,0 houveram uma queda brusca após 3h de análise, atingindo total inativação da enzima. Segundo Kalra e Sandhu (1986) o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pode ser devido a desnaturação das proteínas, pois cada grupo enzimática apresenta um valor ótimo de pH.

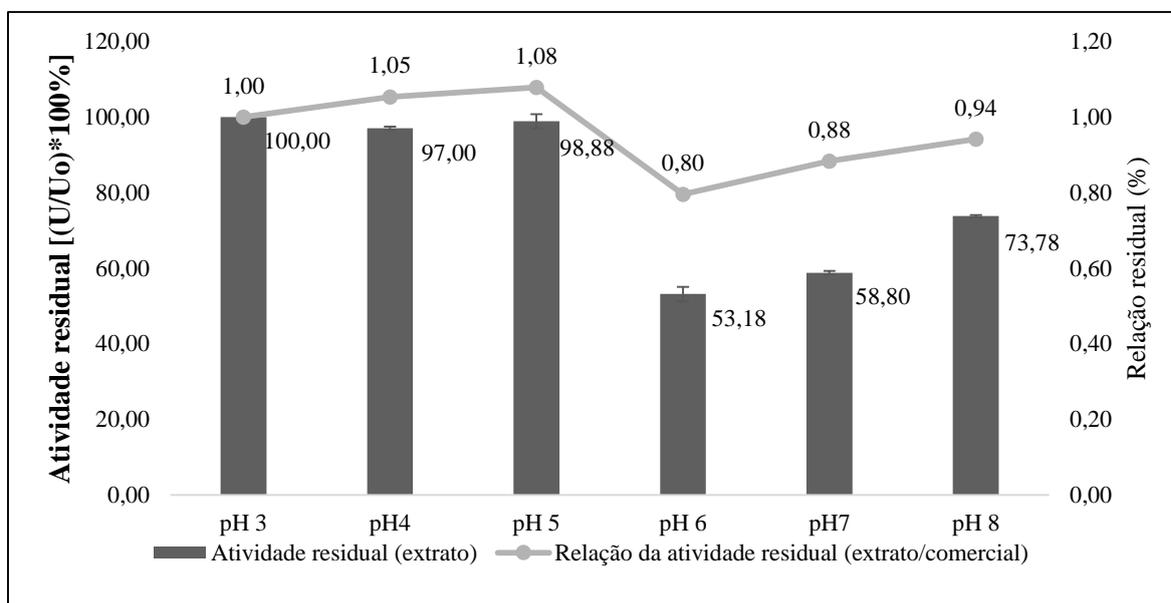
Comparando os valores da xilanase comercial (Sigma®) com a xilanases de *P. roqueforti* ATCC 10110 (figura 9b), Comparando os valores da xilanase comercial (Sigma®) com a xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 na figura 3d., observa-se que a xilanase produzida tiveram rendimentos superiores no pH 3.0 e pH 4.0 em relação a xilanase comercial, além de apresentar um desempenho semelhante em pH 5.0 e pH 6.0. Este comportamento da xilanases produzido por *P. roqueforti* ATCC 10110 é algo promissor para a aplicação industrial principalmente quando o processo é realizado em pH mais ácido, melhorando o desempenho da enzima.

Com base na literatura, o estudo realizado por Heidorne et al. 2006, a estabilidade de xilanases produzidas a partir de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*, foi máxima em pH 5,0, mantendo atividades elevadas após a incubação em pH na faixa de 3,5 até 6,5. Valores ótimos de pH para atividade e estabilidade foram encontrados na faixa de pH 5,0; 55 °C para xilanases produzidas por *P. citrinum*, Tanaka et al. (2005). Para Sapre et al. (2005), as melhores faixas de pH foi entorno de 6,5 a 10,5 na temperatura de 50 °C utilizando o *Bacillus sp.*

### **3.1.10 pH ótimo de reação**

Os resultados do pH ótimo de reação para as xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 podem ser observados na Figura 10. Os teste foram realizados em pH Foi pH 3,0 a pH 8,0, na temperatura de 50 °C por 10 minutos. Atividades de xilanase obtidas foram expressas em relação à sua condição inicial e também em relação ao desempenho apresentado por uma xilanase comercial (Sigma®).

**Figura 1018-** pH ótimo das xilanases apresenta no extrato enzimático bruto obtido por fermentação em estado sólido por *P. roqueforti*. As colunas escuras apresentam a atividade em relação a sua condição inicial de 20,97 UI/g e o gráfico de linha apresentam a atividade relativa em relação à atividade relativa de uma xilanase comercial (Sigma®) sob as mesmas condições e atividade inicial de 156,33 UI/g.



Fonte: dados da pesquisa

O pH ótimo de reação das xilanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 encontra-se entre a faixas de pH de 3,0 a 5,0 (figura 10, barra escura). A maior atividade nesta faixa de pH pode ser resultado de um desdobramento favorável dos resíduos de aminoácido da proteína, tendo como consequência a maior exposição do sítio ativo da enzima e ocorrência de reação.

No entanto, comparando-se os valores da xilanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 com a xilanase comercial (Sigma®) (figura 10, gráfico de linha), nota-se que a xilanase presente no extrato apresentou um comportamento semelhante a enzima comercial sobre condições ácidas, e observa-se que tornando o meio mais alcalino é registrada uma queda superior a 30 % da atividade enzimática (pH 6,0 e pH 7,0)

Os valores encontrados para a xilanase produzida por *P. roqueforti* estão próximos aos valores encontrados no estudo de Polizeli et al. (2005), que relataram que a maioria dos fungos das espécies de *Penicillium*, apresentam pH ótimo na faixa de 2,0 a 3,8. Segundo Palma (2003) as xilanases provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo as melhores atividades enzimáticas constatadas em pH entre 4,0 a 7,0.

Lafond et al (2011) estudaram xilanase GH10 de *Penicillium funiculosum*, cujo os valores ótimos de pH foram entre 4,0 a 5,5. Iniesta-Gonzalez et al. (2013) observaram que

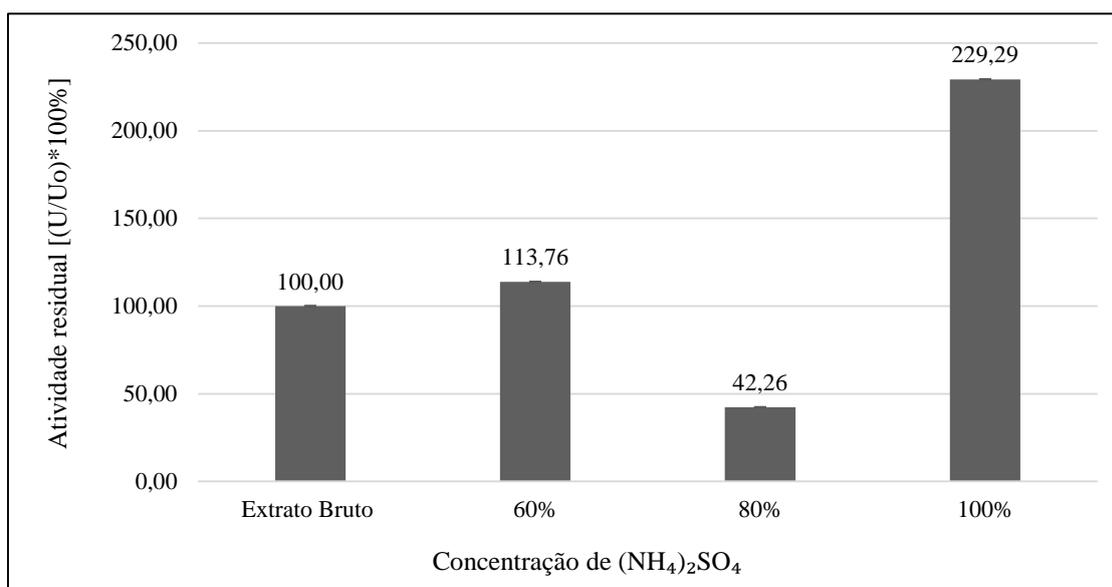
uma endoxilanase de mamão sofre influência muito grande na variação de pH, sendo o ponto ótimo foi no pH de 5,5, outros valores de pH apresentaram uma queda da atividade enzimática.

As xilanases produzidas por *Aspergillus casei* apresentaram atividade enzimática estável entre pH 4,5 a 6,5, com atividade máxima em pH 6,5 (KRONBAUER et al., 2007).

### 3.1.11 Fracionamento do extrato enzimático bruto com sulfato de amônia

A concentração da atividade de xilanase do extrato bruto produzido por *P. roqueforti* em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada por precipitação com sulfato de amônia, uma metodologia de baixo custo e fácil aplicação. Para as condições a 20% e 40% (m/v) de sal, não foram obtidos *pellets*, portanto estas condições não são apresentadas na Figura 11. A maior atividade relativa obtida foi com a precipitação a 100% (m/v) do sal com uma atividade específica de 40,50 U/mg de proteína total.

**Figura 11-** Atividade relativa da xilanase precipitada após a saturação com sulfato de amônia. Com a condição inicial de  $U_0 = 17,66$  U/mg.



Fonte: dados da pesquisa

Resultados observados por Mingote et al. (2014) produziram xilanase por fungo filamentososo isolado do pó de café. Para a concentração da enzima utilizou-se o sulfato de amônia na concentração de 85% (m/v), fração que apresentou maior atividade específica. Saha (2002) utilizaram o sulfato de amônia para pré-concentração da xilanase produzida de *Fusarium proliferatum*, cuja a melhor fração foi de 80% (m/v) com atividade específicas de 4,4 U/mg.

#### 4 CONCLUSÃO

As características físico-químicas do extrato enzimático bruto de xilanase produzido pelo *Penicillium roqueforti* em bagaço de cana, revelou que a enzima apresenta pH e estabilidade ótimo na faixa de pH 3,0-5,0. A estabilidade térmica de xilanase para as temperaturas em estudos (50-60-70-80°C) foi considerada estável. O extrato enzimático bruto não sofreu desativação considerável se armazenada congelado na temperatura de -20°C a 40 dias. A físico-química do bagaço da cana fermentada demonstrou afinidade do fungo. Portanto a fermentação em estado sólido apresenta-se com uma tecnologia que pode propor caminhos alternativos para a reutilização de resíduos agroindustriais, além de produzir xilanase que mostraram-se promissoras para aplicações industriais e biotecnológicas, principalmente para a indústria de alimentos e biocombustíveis.

## 5 REFERÊNCIAS

- BEG, AGUIAR, C. M. de LUCENA, S, L. de; Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology Maringá**, v. 33, p.385-391, 2011.
- BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 396–402, 2000a.
- BEG, Q. K.; KAPPOR, M.; MAHAJAN, L; HOODAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUINS, M.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. Thermozyms and their applications, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-186, 2001.
- BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z, SULTAN, M. T. Xylanases in Baking Industry, **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 22–3, 2008.
- CAMDRA, T. S; CHANDRA, K. purification and characterization of xylanase from alcali-tolerant *Aspergillus fischeri* FXN1. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.457-461, 1996.
- CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETORAGA, M. R.; JORGE, L. A. Production and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process biochemistry**, v.40, p. 359-364, 2005.
- CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; ALBERTI FERREIRA MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; SILVA, F. F.; SILVA, R. R.; CARVALHO, B. M. A. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 125-132, 2006.
- CHANWICHA, A, N.; KATEKAEWB, S.; AIMIC, T.; BOONLUE S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **The Mycological Society of Japan**, v. 56, p. 1618-545, 2014.
- CORDEIRO, C.A.M.; MARTINS, M.L.L.; LUCIANO, A. B.; SILVA, R.F. Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, p. 413-418, 2002.
- 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. **Lettrs in applied microbiology**, v. 44, p. 206-211, 2007.

GALEMBECK, F., BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais Na inovação química. **Química Nova**, v. 32, p. 571–581, 2009.

GERON, L. J. V.; MIGUEL, G. Z.; MEXIA, A. A.; CRUZ, C.; NETO, R. M.; SCHUMANN, A. M. Composição química, valor de pH e temperatura do bagaço de cana-de-açúcar in natura e hidrolisado com cal (cao) conservados em mini silos. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 8, p. 57- 68, 2010.

GHOSE, T. K. International Union Of Pure and Applied Chemistry: Measurement Of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59. p. 257-268, 1987.

GOMES, E.; SOUZA, S. R.; PICOLO-GRANDI, R.; SILVA, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.75-82, 2005.

GONG, X.; GRUNINIGER, R. J.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M.; McALLISTER, T. A. Biochemical analysis of a high specific, pH stable xylanase gene identified from a bovine rumen-derived metagenomic library. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.97, p. 2423-2431, 2013.

GOWDHAMAN, D. MANASWINI, V. S. JAYANTHI, V. DHANASRI, M. JEYALAKSHMI, G. GUNASEKAR, V. SUGUMARAN, K. R. Ponnusam Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 90–98, 2014.

GUO, B.; LI, P.-Y.; YUE, Y.-S.; ZHAO, H.-L.; DONG, S.; SONG, X.-Y.; SUN, C.-Y.; ZHANG, W.-X.; CHEN, X.-L.; ZHANG, X.-Y.; ZHOU, B.-C.; ZHANG, Y.-Z. Gene Cloning, Expression and Characterization of a Novel Xylanase from the Marine Bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1173-1187. 2013.

HEIDORNE, F.; MAGALHÃES, P., FERRAZ, A.; MILAGRES, A. F. Characterization of hemicelulases and celulasas produced by *ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.

INIESTA-GONZALEZ, J. J.; LINO-LOPES, G. J.; PAULL, R. E.; DE LA ROSA, A. P. B.; MANCILLA-MARGALLI, N. A.; SANUDO-BARAJAS, J. A.; IBARRA-JUNQUERA, V.; CHEN, N. J.; HERNANDEZ-VELASCO, M. A.; OSUNA-CASTRO, J. A. Papaya endoxylanase biochemical characterization and isoforms expressed during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v.81, p. 13-22, 2013.

KALRA, M. K.; SANDHU, D. K. Optimal production of cellulolytic enzymes and their location in *trichoderma pseudokonigii*. **Acta Biotechnologica**, v.6, p. 161–166, 1986.

KANSOH, A. L.; NABIEB, A. A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 103- 114, 2004.

KRONBAUER, E. A. W.; ROSANE MARINA PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. **Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes**

**de carbono.** Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 25, p. 207-216, 2007.

KULKARNI, NEETA; SHENDYE, ABHAY; RAO, MALA. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E.; GIARDINA, T. GH10. xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 20-28, 2011.

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

LEMOS, J. L. S.; BOM, E. P. S.; SANTANA, M. F. E.; JUNIOR, N. P. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 206-211, 2000.

LI, Y.; CUI, F.; LIU, Z.; XUD, Y.; ZHAOA, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40. p. 1381–1388, 2007.

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

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* Pse A in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v.99, p.1729-1735, 2008.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B; NAGEM, R. A.; DE VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules** Oct; v. 91, p.60-7. 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426–428, 1959.

MINGOTE, R. G. M.; GOULART, A. J.; MARTINEZ, J. P.; MONTI, R. Produção de xilanase por fungo filamentoso isolado do pó de café utilizado. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.25, 2004.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.165, 2003.

PARK, Y.; KANG, S.; LEE, J.; HONG, S.; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p.761-766, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.;

AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian archives of Biology and Tecnology**, v. 49, p. 475-480, 2006.

REDERICK, M. M.; KIANG, C-H.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. **Biotechnology Bioengineering**, v. 27, p. 525-532, 1985.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597-603 (2013).

RORIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. CRC Press, v.1, p.336, 2014.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanases from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 1279-1284, 2002

SAHA, S. P.; GHOSH. S. Otimização da produção de xilanase por *Penicillium citrinum* xym2 e aplicação na sacarificação de agro-resíduos. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2014.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 85-94, 2009.

SANJIVKUMAR, M.; SILAMBARASAN, T; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Biosynthesis, Purification and Characterization of  $\beta$ -1,4-Xylanase From a Novel Mangrove Associated Actinobacterium *Streptomyces Olivaceus* (MSU3) and Its Applications. **Protein Expression and Purification**. v. 130, p.1-12. 2016

SAPRE, M. P.; JHA, H.; PATIL, M. B. Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from *Bacillus* sp. **World Journal of Microbiology E Biotechnology**, v. 21, p. 649-654, 2005.

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; FILHO, A. Z.; RAMOS, P. L.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation, **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97–107, 2015.

SEGEL, I. H. **Bioquímica, Teoria e Problemas**. Traduzido Grassiano, D. M. Rio de Janeiro: Livros técnico e científicos, v.1 p. 577-1979.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3ed. Viçosa: UFV, v. 3, p.235, 2009.

SILVA, G.F.A. DA.; THOMEIO, J. C.; Efeito da variação da fonte de nitrogênio sobre as

atividades de celulasas, xilanase e amilase produzidas pelo fungo *Myceliophthora Thermophila* I-1D3b a partir de fermentação semissólida com farelo de trigo. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. **EN ITEC**, v. 1, p. 1-42016.

SILVA, L. A. O. **Produção, purificação e caracterização das xilanases de *Trichoderma in hamatum***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) –Instituto de Biotecnologias, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p. 96, 2006.

SIQUEIRA, F. G. de; SIQUEIRA, L. G. de; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

SOUZA, L. S.; SOUZA, L. O.; REIS, N. S.; Franco, Marcelo. Enriquecimento Proteico da Palha do Café através da Fermentação em Estado Sólido por *Penicillium roqueforti*. In: 68 Reunião Anual da SBPC, 2016, Porto Seguro. **68 Reunião Anual da SBPC**, 2016.

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

TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. (2005), Purification and Properties of an Extracellular Endo-1, 4- $\beta$ -Xylanase from *Penicillium citrinum* and Characterization of the Encoding Gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, p. 623-630, 2005.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–16.

TUNG, Q. T.; MIYATA, N.; IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 97, p. 329-335, 2004.

ZHENG, H. C.; SUN, M. Z.; MENG, L. C.; PEI, H. S.; ZHANG, X. Q.; YAN, Z.; ZENG, W. H.; ZHANG J. S.; HU, J. R.; LU, F. P.; SUN, J. S. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its Application in Xylooligosaccharides Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p.489-96, 2014