



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA XILANASE**  
**PRODUZIDA PELO FUNGO AMAZÔNICO *Pycnoporus sanguineus* L. F.**

**(MURR)**

Doutoranda: **Cynara da Cruz Carmo**  
Orientadora: **Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva**  
Co-Orientadora: **Profa. Dra. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira**

**Manaus – AM**  
**2011**

CYNARA DA CRUZ CARMO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA XILANASE  
PRODUZIDA PELO FUNGO AMAZÔNICO *Pycnoporus sanguineus* L. F.  
(MURR)**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

**Manaus – AM  
2011**

CYNARA DA CRUZ CARMO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA XILANASE  
PRODUZIDA PELO FUNGO AMAZÔNICO *Pycnoporus sanguineus* L. F.  
(MURR)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva  
Orientadora

Profa. Dra. Flávia Regina A. C. Naief Moreira  
Co-Orientadora

Prof. Dr. José Renato P. Cavallazzi (UFAM)  
Titular

Profa. Dra. Luciana Leomil (UFAM)  
Titular

Profa. Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho (UFAM)  
Titular

Profa. Dra. Helena T. Camarão (UEA)  
Titular

## **DEDICATÓRIA**

**A Deus, o colo que procurei e sempre encontrei!**

**Ao maravilhoso presente divino... Prolongamento da minha vida... Alegria e razão da minha eterna busca por uma vida melhor...**

**Meu Filho Pedro Luca!**

**A minha querida mãe Alaíde, que nunca mede esforços para estar sempre ao meu lado.**

**Obrigada por cada dia que cuidou do meu filho na minha ausência!**

**Ao meu amado pai Rubem dos Santos (*in memoriam*), o exemplo de dedicação, sabedoria e amor pela Educação... Minha eterna fonte de inspiração...**

**Que saudades!**

**Ao meu amor e companheiro. Júnior, sem você e sua compreensão tudo seria mais difícil.**

**Obrigada pela força e paciência, é um tempo que não volta, mas, pode ser recompensado!**

**A minha irmã e sobrinhos...**

**Como é importante o carinho de vocês!**

**Aos meus amigos...**

**Como é importante tê-los ao meu lado!**

***“ O futuro tem muitos nomes; para os fracos, ele é inatingível; para os temerosos, ele é desconhecido; para os corajosos, ele é a chance.”***

***Vitor Hugo***

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade de realizar meus estudos.

Ao professor Dr. Ademir Castro e Silva, pela oportunidade de tê-lo como mestre, mentor e amigo. Serei eternamente grata!

A professora Dra. Leonor Alves, pelo exemplo de dedicação e amor pelo trabalho no desenvolvimento de pesquisa. Sem você não teria conseguido!

A professora Dra. Flávia Regina, pelo incentivo e confiança. Exemplo de comprometimento.

Ao professor David Xavier, diretor do Centro de Estudos Superiores de Parintins, pela força, incentivo, parceria e confiança. Seu compromisso com a Educação é admirável e contagiante!

Aos professores e amigos do Departamento de Biologia do CESP. Vocês foram parceiros e amigos. Contem comigo!

A Francisca, Ieda, Naimy, Megara e Joeliza, minhas amigas e parceiras nesta jornada na vida acadêmica e luta nas conquistas profissionais. Estamos conseguindo!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	lx
LISTA DE TABELAS	Xi
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
Introdução	01
1 Objetivos	03
1.1 Geral	03
1.2 Específicos	03
2 Revisão Bibliográfica	04
2.1 <i>Pycnopus sanguineus</i>	04
2.2 Enzimas	06
2.2.1 O valor Comercial das enzimas	08
2.3 Xilano	11
2.4 Xilanase	14
2.5 Aplicação Comercial de Xilanases	16
2.6 Xilanases Fungicas	18
3 Material e Métodos	21
3.1 Microrganismos	21
3.2 Meio de Cultura para Otimização Fungica	21
3.3 Otimização de pH e Temperatura	22
3.4 Quantificação do Crescimento Fungico	23
3.5 Produção do complexo enzimático e purificação parcial da principal enzima excretada por <i>P. sanguineus</i> em meio líquido de malte	24
3.5.1 Otimização do tempo de cultivo para a produção do complexo enzimático	24
3.5.2 Atividade Xilanase	24
3.5.3 Atividade $\beta$ -Xilosidase	25
3.5.4 Atividade da $\beta$ -Glicosidase	25
3.5.5 Atividade de CMCCase	26
3.5.6 Atividade de Avicelase	26
3.5.7 Atividade de Lacase	27
3.5.8 Determinação de Proteínas	27
3.5.9 Cinética da produção de xilanase	27
3.5.10 Influência da Temperatura e do pH sobre a produção de xilanase	27
3.5.11 Purificação Parcial de xilanases	28
3.5.12 PAGE-SDS	29
3.5.13 Coloração com nitrato de prata	29
3.6 Caracterização de Xilanase parcialmente purificada	30
3.6.1 Determinação do pH e temperatura ótima	30
3.6.2 Determinação da estabilidade térmica	30

3.6.3 Determinação da estabilidade de xilanase parcialmente purificada em diferentes pHs	30
3.6.4 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes	31
4 Resultados e Discussão	32
4.1 Influência do meio e pH no crescimento de <i>P. sanguineus</i>	32
4.2 Influência da Temperatura no crescimento de <i>P. sanguineus</i>	34
4.3 Otimização do tempo de cultivo para a produção do complexo enzimático de <i>P. sanguineus</i>	35
4.4 Efeito do pH e da temperatura sobre a produção de xilanase excretada por <i>P. sanguineus</i>	38
4.5 Purificação parcial da Xilanase excretada por <i>P. sanguineus</i>	40
4.6 PAGE-SDS	42
4.7 Caracterização da xilanase parcialmente purificada de <i>P. sanguineus</i>	43
4.7.1 Temperatura e pH ótimo da xilanasas parcialmente purificada	43
4.7.2 Estabilidade Térmica e em diferentes pHs da xilanase parcialmente purificada excretada por <i>P. sanguineus</i>	45
4.7.3 Parâmetros cinéticos aparentes da xilanase parcialmente purificada de <i>P. sanguineus</i>	48
5 Conclusão	50
6 Referências Bibliográficas	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Corpo frutífero do fungo <i>P. sanguineus</i>	06
<b>Figura 2:</b> Esquema da composição da parede celular dos vegetais em madeiras moles	13
<b>Figura 3:</b> Estrutura de xilano representado em madeiras duras	13
<b>Figura 4:</b> Estrutura de xilano representado em madeiras macias	13
<b>Figura 5:</b> Esquema da degradação completa de arabinoxilano, apresentando as enzimas envolvidas no processo	15
<b>Figura 6:</b> Crescimento micelial do <i>P. sanguineus</i> em diferentes meios de cultura e pH a temperatura ambiente	30
<b>Figura 7:</b> Crescimento micelial do fungo <i>P. sanguineus</i> em meio Agar-malte com 2% de glicose, pH 5,0 em diferentes temperaturas	32
<b>Figura 8:</b> Cinética de produção do complexo enzimático <i>P. sanguineus</i>	35
<b>Figura 9:</b> Efeito do pH inicial de cultivo sobre a produção de xilanase excretada por <i>P. sanguineus</i> . O cultivo foi realizado em meio líquido de Malte com glicose a 2% (m/v), a 35°C e 120 rpm por 8 dias	37
<b>Figura 10:</b> Efeito da Temperatura sobre a produção de xilanase excretada por <i>P. sanguineus</i> . O cultivo foi realizado em meio líquido de Malte com glicose a 2% (m/v), pH 6,5 e 120 rpm por 8 dias	38
<b>Figura 11:</b> Perfil cromatográfico em HiTrap SP XL para a xilanase parcialmente purificada de <i>P. sanguineus</i> . A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, e eluída com um gradiente salino linear, a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL	40

<b>Figura 12:</b> Perfil PAGE-SDS em gel 12 % de poliacrilamida, para xilanase de <i>P. sanguineus</i> . (a) Da esquerda para a direita: (1) xilanase parcialmente purificada;(2) padrões de massas moleculares: 170,130, 95, 72, 55, 43, 34, 26 e 17 kDa (b) Um gráfico de log $M_r$ , das proteínas marcadoras versus a migração relativa durante a eletroforese	41
<b>Figura 13:</b> Efeito do pH sobre as atividades das xilanase parcialmente purificada de <i>Pycnopus sanguineus</i> . No referido ensaio foi utilizada tampão McIlvaine (pH3,0 – 8,0) e tampão glicina NaOH (pH 8,5 a 11,0)	42
<b>Figura 14:</b> Efeito da temperatura sobre as atividades das xilanase parcialmente purificada de <i>Pycnopus sanguineus</i>	43
<b>Figura 15:</b> Estabilidade térmica a 65°C, 75°C e 85°C da xilanase parcialmente purificada excretada por <i>P. sanguineus</i>	44
<b>Figura 16:</b> Estabilidade em diferentes valores de pHs da enzima xilanase parcialmente purificada excretada por <i>P. sanguineus</i> , em 24h, 48h e 72h de incubação a 28°C	45
<b>Figura 17:</b> Gráfico do duplo-recíproco para determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da xilanase purificada de <i>P. sanguineus</i> . Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 8,0, a 75 °C	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação Internacional das Enzimas	08
<b>Tabela 2:</b> Distribuição do volume de enzimas por área industrial	09
<b>Tabela 3:</b> Análise de variância (ANOVA) com efeito do pH no crescimento micelial do <i>P. sanguineus</i>	33
<b>Tabela 4:</b> Teste de Tukey com pareamento das médias dos pHs testados	33
<b>Tabela 5:</b> Atividade enzimática do fungo <i>P. sanguineus</i> sob condição de agitação e estacionária em meio malte sem acréscimo de glicose como fonte de carbono a 30°C	35
<b>Tabela 6:</b> Atividade enzimática do <i>P. sanguineus</i> com e sem agitação de 120 rpm em meio líquido de malte com e sem acréscimo de glicose	36
<b>Tabela 7:</b> Atividade enzimática de CMCase, avicelase e lacase, em agitação de 120 rpm em meio líquido de malte e com acréscimo de glicose	38
<b>Tabela 8:</b> Tabela de purificação parcial de xilanase de <i>P. sanguineus</i>	41

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- *P. sanguineus* *Pycnoporus sanguineus*
- p/p           Peso/peso
- p/v           Peso/volume
- v/v           Volume/volume
- m/v           Massa/Volume
- p.a.           Para análise
- $K_m$            Constante Michaelis-Menten
- $V_{m\acute{a}x}$         Velocidade máxima de reação
- KDa           Kilodaltons
- CMC           Carboximetilcelulose
- DNS           ácido 3,5-dinitrosalicílico
- ABTS          Sal diamônio 2,2-azino-bis (3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico)
- pNPG         p-nitrofenil- $\beta$ -Glicopiranosídeo
- pNPX         p-nitrofenil- $\beta$ -Xilopiranosídeo
- rpm           Rotações por minuto
- IU            Unidade Internacional
- $\mu$ l            Microlitro
- $\mu$ mol          Micromol
- nm            Nanômetro
- UEA           Universidade do Estado do Amazonas
- UFAM         Universidade Federal do Amazonas

## RESUMO

*Pycnoporus sanguineus* são excelentes degradadores de matéria orgânica, apresentando importante papel em seu habitat. No presente trabalho, uma linhagem de *Pycnoporus sanguineus* isolada do solo de área rural do Município de Parintins, Amazonas, Brasil, foi cultivada em meio sólido de malte, a 35<sup>o</sup>C, por 8 dias, para obtenção da cultura pura e meio líquido de malte acrescido de 2% de glicose e 120 rpm por um período de 10 dias para produção das enzimas xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -glicosidase, CMCase, avicelase e lacase. Entre essas enzimas, a produção de xilanase foi avaliada e a enzima foi parcialmente purificada e caracterizada. Produção ótima foi obtida em pH 6,5 a 35 °C, 120 rpm e 196h de cultivo. O filtrado de cultura (200 mL), obtido nas condições otimizadas nas etapas anteriores, foi precipitado a 70% de sulfato de amônia e centrifugado por 60 minutos a 4<sup>o</sup>C e rotação de 4 000 rpm. Um mL da fração precipitada na qual detectou-se atividade xilanolítica, foi filtrado utilizando um filtro Millex GV 0,22 $\mu$ m (durapore PYDF Membrane) e posteriormente injetada em um cromatógrafo tipo AKTA Purifier UPC 900, sistema UNICORN 5.11; utilizando uma coluna de troca aniônica HiTrap SP XL, capacidade 1mL, previamente equilibrada no tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4. O índice de pureza, das frações que apresentaram atividade xilanase, bem como seus perfis protéicos, foram analisadas eletroforéticamente em PAGE-SDS (12% de poliacrilamida), onde a massa molar determinada foi de 39,44 kDa. As condições ótimas para atividade da enzima foram 75 °C e pH 8,0. A estabilidade térmica da enzima xilanase de *P. sanguineus* parcialmente purificada foi alta de 65 a 85<sup>o</sup>C, sendo mais estável a 75<sup>o</sup>C. A estabilidade em diferentes pHs foi alta entre 4,5 e 8,8. Com xilano de birchwood (2,0 a 50 mg/mL), o valor de *Km* da enzima foi de 0,32786 mg/ml, e o valor de *Vmax* foi de 12,70648  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> quando a reação foi realizada a 75<sup>o</sup>C e pH 8,0. Esses resultados indicam o possível emprego desse complexo enzimático em processos industriais que requeiram o uso de xilanasas em pH alcalino e alta estabilidade em diferentes pHs e altas temperaturas.

**Palavras-chave:** *Pycnoporus sanguineus*, enzimas hidrolíticas, xilanase

## ABSTRACT

*Pycnoporus sanguineus* are excellent decomposers of organic matter, presenting important role in its habitat. In this study, a strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from soil of rural area of Parintins, Amazonas, Brazil, was grown on solid medium of malt, 35 °C for 8 days to obtain a pure culture and malt liquid medium plus 2% glucose and 120 rpm for a period of 10 days to produce the enzyme xylanase,  $\beta$ -xylosidases,  $\beta$ -glucosidase, CMCase, and laccase avicelase. Among these enzymes, the production of xylanase was evaluated and the enzyme was partially purified and characterized. Optimum yield was obtained at pH 6.5 at 35 °C, 120 rpm and 196h of cultivation. The culture filtrate (200 mL), obtained under the conditions optimized in the previous steps, was precipitated at 70% ammonium sulfate and centrifuged for 60 min at 4 °C and rotation of 4000 rpm. One mL of the fraction precipitated in which xylanolytic activity was detected, was filtered using a filter Millex GV 0.22 micrometre (Durapore Membrane PYDF) and subsequently injected into a chromatograph type AKTA Purifier UPC 900, 5:11 UNICORN system, using an anion exchange column HiTrap SP XL 1 mL capacity, equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 7.4. The degree of purity, the fractions that showed xylanase activity, as well as their protein profiles were analyzed by electrophoresis on SDS-PAGE (12% polyacrylamide), where the molar mass of 39.44 kDa was determined. The optimal conditions for enzyme activity were 75 °C and pH 8.0. The thermal stability of the xylanase enzyme from *P. sanguineus* was partially purified high 65 to 85 °C, being more stable 75 °C. The stability at different pHs was high between 4.5 and 8.8. With birchwood xylan (2.0 to 50 mg / mL), the Km value of the enzyme was 0.32786 mg / ml, and the Vmax value was 12.70648 mol min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> when the reaction was performed at 75 °C and pH 8.0. These results indicate the possible use of this enzyme complex industrial processes that require the use of xylanases at alkaline pH and high stability in different pHs and high temperatures.

Keywords: *Pycnoporus sanguineus*, hydrolytic enzymes, xylanase

## INTRODUÇÃO

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais.

Apesar do seu papel nos ecossistemas e suas aplicações na biotecnologia, o conhecimento sobre os fungos ainda permanece num nível incipiente, onde estima-se que somente cerca de 5% das espécies é conhecida, e que muito pouco é conhecido sobre a sua biologia. A diversidade fúngica pode ser avaliada quando o número de espécie mundial, segundo Smânia (2003) “é estimado em aproximadamente 1,5 milhões; entretanto somente 69.000 foram descritas”. Colocam os fungos como o segundo maior reino, suplantado apenas pelos insetos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; MANCILHA, 2006).

Entre os basidiomicetos, membros do gênero *Pycnoporus* têm se mostrado como produtores de várias enzimas de aplicações industriais como xilanase e  $\beta$ -glicosidase (ESPOSITO *et al.* 1993), invertase,  $\alpha$ -amilase e lacase, sendo que ainda há relativamente poucos trabalhos sobre a purificação e caracterização das enzimas produzidas por este fungo (COUTO, 2004).

As propriedades terapêuticas dos Basidiomycetes vêm sendo reconhecidas por milênios pelos povos orientais, sendo que os primeiros livros chineses sobre produtos naturais, medicinais, datam 200 anos atrás (KAJIANG; ROBERTS, 1986). Dentre os metabólitos produzidos por esses fungos devemos destacar a cinabarina, um derivado fenoxazínico com atividade antibacteriana e antiviral, encontrado em *Pycnoporus sanguineus*

(SMÂNIA; *et al*, 1998). O *P. sanguineus* é conhecido popularmente como “orelha-de-pau”, devido ao hábito do basidioma (LACAZ *et al.*, 2002; VIEIRA, 2005).

Apesar do número limitado de publicações envolvendo este fungo, há uma tendência crescente de seu emprego em processos biotecnológicos, pois *P. sanguineus* já foi utilizado com sucesso na descoloração de efluentes Kraft (VALERIANO *et al.*, 2007) e na descoloração de diferentes corantes (CASTRO E SILVA, 2011).

Dentre os principais produtos representantes dos processos biotecnológicos figuram as enzimas, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade e controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. Investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de novas aplicações e de bioprocessos no setor industrial de produção de enzimas têm sido realizados recentemente.

Uma nova fonte de  $\alpha$ -amilase foi identificada em *Pycnoporus sanguineus* (DE ALMEIDA; MIZUTA & GIGLIO, 1997 *apud* PANDEY *et al.*, 2000). Este fungo possui um “pool” enzimático que de acordo com Castro e Silva *et al*, (2011), passa pela produção em meio “agar-malte” de lignina-peroxidase, peroxidase, lacase- Mn-peroxidases,  $\beta$ -glicosidase, celulase e xilanase.

Portanto, em vista da importância destes aspectos, o presente trabalho objetivou purificar parcialmente e caracterizar a enzima xilanase produzida pelo fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus*, e os resultados oriundos deste trabalho se revestem de grande importância e relevância da biotecnologia no Estado do Amazonas, uma vez que se volta a aplicação industrial de fungos que notadamente são reconhecidos apenas como deterioradores de madeira, com pouco conhecimento sobre o seu grande potencial biotecnológico.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 GERAL

- Purificar parcialmente e caracterizar a enzima Xilanase produzida pelo fungo amazônico *Pycnoporus sanguineus*, em meio malte

### 1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as condições de crescimento do fungo *P. sanguineus* (meio de cultura, pH e temperatura)
- Investigar a produção das enzimas xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -glicosidase, CMCase, avicelase e lacase pelo fungo *P. sanguineus*
- Verificar a influência do meio de cultura, pH e temperatura na produção de  $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase pelo *P. sanguineus*
- Determinar as condições de produção de Xilanase pelo fungo *P. sanguineus* : estacionário/agitado, pH e temperaturas ótimos
- Obter o principal componente xilanolítico excretado por *P. sanguineus*
- Determinar pH e temperatura ótima da enzima parcialmente purificada
- Verificar estabilidade térmica e estabilidade em diferentes pHs da enzima parcialmente purificada.
- Determinar os parâmetros cinéticos aparentes da enzima parcialmente purificada ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ )

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pycnoporus sanguineus*

O fungo *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto da ordem Polyporales e família Polyporaceae (NOBLES, 1965 citado por CASTRO E SILVA, 2008). É um fungo amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em florestas tropicais, como a Floresta Amazônica (ESPOSITO *et al.*, 1993). É encontrado sobre a madeira, na qual se fixa e da qual se alimenta, sendo por isso denominado popularmente como orelha de pau e tornou-se conhecido por suas características fitoterápicas, antibacteriana, antifúngica e atividade adstringente.

O *Pycnoporus sanguineus* foi descrito como sendo um carpóforo anual, semelhante à cortiça, bem delgado e flexível, apresentando himênio enrugado, com tubos ou poros em sua face inferior, de cor vermelho-ladrilho (Figura 01), que por ser capaz de oxidar polissacarídeos da parede celular e lignina são chamados de fungos de decomposição branca, possuindo rápida propagação no ambiente, devido a grande produção de esporos (TEIXEIRA *et al.*, 1997). Nesse tipo de degradação, tanto a lignina como os polissacarídeos são degradados.

Os fungos de podridão branca podem agir de duas maneiras distintas: uma envolvendo a remoção simultânea de todos os componentes e outra, menos frequente, envolvendo a remoção seletiva de lignina e polioses, mantendo a celulose praticamente intacta. As células são atacadas inicialmente a partir da camada S<sub>3</sub> da parede secundária em direção à lamela média (WILCOX, 1968). A madeira atacada por fungos nesta classe adquire uma aparência esbranquiçada e se rompem facilmente no sentido das fibras.

Muita atenção tem sido dada a identificação das atividades hidrolíticas do *P. sanguineus* devido ao seu uso potencial em diferentes indústrias como a de papel, de alimentos animais e humanos, têxtil e de corantes, biopolpação,

biorremediação e produção de bioetanol a partir de celulose (ALBORE´S *et al.* 2006).

A biopolpação pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora* já foi explorada por diversos autores (AKHTAR *et al.*,1992; BLANCHETTE, 1992; FISCHER *et al.*,1994; SCOTT *et al.*, 1995; FERRAZ *et al.*,2006). Porém sabe-se que a principal dificuldade de aplicar a biopolpação por esta espécie em escala industrial reside na sua suscetibilidade à contaminação. O processo de fermentação em estado sólido, a biopolpação, é influenciado por diversos fatores, como a espécie de fungo utilizado e o tipo de substrato e as condições de cultivo, sendo assim torna-se importante estudar diversas espécies nativas de fungos para o tratamento prévio de diferentes madeiras.

Segundo Lamascolo *et al.* (2002) as linhagens de origem tropical e subtropical do fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentam maior quantidade de enzimas lignolíticas que as linhagens de outras regiões, apresentando inclusive bastante promissor devido sua capacidade de produzir enzimas lignolíticas.

Enzimas de *Pycnoporus sanguineus* como celulasas e xilanasas, têm sido utilizadas com sucesso para a descoloração de efluente kraft e na descoloração de diferentes corantes (ESPOSITO *et al.*, 1993; POINTING & VRIJMOED, 2000).

Foi também relatada a produção de alfa-amilase, celulasas e xilanase com uso industrial em processos economicamente competitivos utilizando resíduos agrícolas por esse fungo (ALMEIDA *et al.*, 1997; QUIROZ-CASTAÑEDA *et al.*, 2009; 2011).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* tem sido usado na medicina popular por tribos indígenas das Américas e África para tratamento de diversas injúrias, como reumatismo, artrite e gota. Quando moído e em infusão é usado disenteria, cistos subcutâneos, verrugas e para desinflamar os pés (PÉREZ-SILVA, *et al.*, 1988).

Além das características citadas, Zulfadhly *et al* (2001), indicam o uso de *Pycnoporus sanguineus* para remoção de metais pesados como  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  fixados na coluna do leito de rios.

Smânia *et al.* (1998) realizaram estudos com *P. sanguineus* observando a síntese de metabólitos secundários e a atividade antimicrobiana contra bactérias de produtos alimentícios, graças a presença de cinnabarina, um

antibiótico de coloração alaranjada, o fungo inibiu o crescimento de algumas bactérias muito comuns em alimentos como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.



**Figura 01:** Corpo frutífero do fungo *P. sanguineus*

## 2.2 Enzimas

Segundo Lehninger (2011), a catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas.

A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos, ou contrair um músculo simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise. Uma enzima contorna estes problemas fornecendo um ambiente específico dentro do qual uma reação dada é energeticamente mais favorável e através de sequências organizadas, catalisam as centenas de reações graduais e sucessivas que ocorrem nas vias metabólicas, através das quais as moléculas nutrientes são degradadas, a energia química conservada é

transformada e as macromoléculas biológicas sintetizadas a partir de precursores simples. (LEHNINGER, 2011).

A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato. O complexo enzima-substrato tem papel central na reação enzimática, ele é o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas enzimaticamente e para as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos. (LAGUNA, 1969; LEHNINGER, 2011).

As enzimas foram então classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada. (Tabela 01). A maioria das enzimas catalisa a transferência de elétrons, átomos ou grupos funcionais. Assim, elas são classificadas, recebem nomes e números de código de acordo com a reação de transferência, o grupo doador e o grupo receptor. (LAGUNA, 1969; LEHNINGER, 2011).

**TABELA 01 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DAS ENZIMAS**

<b>Nº.</b>	<b>Classe</b>	<b>Tipo de reação catalisada</b>
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação.

**Fonte: LEHNINGER (2011).**

### **2.2.1 O Valor Comercial das Enzimas**

Nos últimos anos novas companhias têm surgido com novas tecnologias para isolamento e produção de enzimas. Aproximadamente 75% das enzimas industriais são usadas para hidrólise e despolimerização de substâncias naturais complexas, com a protease dominando o mercado devido seu uso nas indústrias de detergente e laticínios (LOWE, 2001; NAGASHIRO, 2007). A maior aplicação ocorrendo na categoria de detergentes.

As aplicações na área de alimentos podem ser bastante variadas e a distribuição dos tipos de enzimas na indústria alimentícia pode ser observada na tabela abaixo (Tabela 02).

**TABELA 02 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE ENZIMAS ALIMENTÍCIAS.**

ENZIMAS	DISTRIBUIÇÃO
Glicoamilase	20%
Alfa-amilase	16%
Glicose isomerase	15%
Papaína	3%
Tripsina	3%
Outras proteases	2%
Fitase	2%
Pectinase	2%
Outras	12%

Valor total = US\$ 1,5 bilhão

Fonte: (GODFREY E WEST, 1996).

A produção comercial de enzimas sofreu grande expansão desde os anos 60 devido ao desenvolvimento da tecnologia de fermentação e mais recentemente pela introdução da engenharia genética. Microrganismos recombinantes estão agora se tornando a principal fonte para uma ampla variedade de tipos de enzimas. Não resta dúvida que a tendência no futuro é essa produção aumentar, principalmente, pela facilidade da manipulação genética e a descoberta de uma variedade de enzimas disponíveis de microrganismos encontrados em ambientes adversos. Muitas enzimas animais, como lipases, pepsina e proteases, têm sido descritas e desenvolvidas para substituir muitas outras enzimas existentes de origem animal e vegetal (BHATIA *et al*, 2002; BUCHANAN, 2007)

No que diz respeito às enzimas animais, ainda nos dias atuais, tecidos e órgãos de animais são excelentes fontes de lipases, esterases e proteases, as mais notáveis sendo pepsina, tripsina e quimosina. Ovos de galinha continuam sendo uma boa fonte para lisozima. Plantas cultivadas servem como fontes

de proteases, como por exemplo, a papaína do mamão, a bromelina do abacaxi e a ficina do *Ficus* (BHATIA *et al.*, 2002).

Por outro lado, microrganismos são as fontes mais convenientes de enzimas. Técnicas de engenharia genética têm contribuído com a indústria de enzimas aumentando a produtividade de fermentação enzimática. Mesmo as propriedades dessas enzimas podem ser alteradas e melhoradas pela engenharia da proteína (ARCHER *et al.*, 2001).

Vários tipos de enzimas hemicelulases, por exemplo, em conjunto com pectinases e celulases podem ser utilizadas na indústria alimentícia para clarificação de sucos e vinhos (GATTI, 1997; SZJÁRTÓ *et al.*, 2004).

Com o desenvolvimento da biotecnologia o espectro de uso da amilase tem se expandido para o campo clínico, medicinal e da química analítica (PANDEY *et al.*, 2000).

As amilases produzidas por fungos são glicoproteínas contendo resíduos de manose. São menos estáveis ao calor do que as amilases bacterianas e são inativadas antes que a temperatura de gelatinização do amido seja alcançada, geralmente em torno de 68-70 °C (UHLIG, 1998).

A  $\beta$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glico-maltohidrolase, EC 3.2.1.2) é geralmente de origem vegetal, mas existem alguns microrganismos que podem produzi-la.  $\alpha$ -Amilase (endo 1,4- $\alpha$ -D- glico-glicohidrolase, E.C. 3.2.1.1), por outro lado, pode ser derivada de várias bactérias, leveduras e fungos. A hidrólise em alta temperatura minimiza a polimerização da D-glicose em iso-maltose (BHATIA *et al.*, 2002; MARTINS, 2005).

As lacases são enzimas que necessitam de cobre para catalisar a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos reduzindo o oxigênio da água (CLAUS, 2004). Estas enzimas têm sido estudadas enfocando sua aplicabilidade industrial, principalmente na sua capacidade em degradar compostos xenobióticos e corantes têxteis (COUTO *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; MAMMA *et al.*, 2009).

Uma especial atenção tem sido dada ao uso da enzima  $\beta$ -xilosidase purificada devido à sua importância em reações de transxilosilação na síntese de  $\beta$ -xilósídeos (PAN *et al.*, 2001). Várias técnicas para extração e purificação de  $\beta$ -xilosidase, incluindo precipitação e extração líquido-líquido, têm sido

reportadas (CORTEZ, PESSOA Jr, 1999; PAN *et al.*, 2001; HASMANN *et al.* 2001;).

Celulose e hemicelulose são os carboidratos mais abundantes na natureza. Desta forma, enzimas que degradam material celulósico, em particular enzimas celulolíticas e xilulolíticas microbianas, têm recebido considerável atenção por sua potencial aplicação em processos industriais, agrícolas e por sua importância ambiental (MAGALHÃES, 2005).

Endoglucanases (EC 3.2.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações  $\beta$ -1,4 em D- glicanas que contenham ligações  $\beta$  -1,3. As endoglucanases são também conhecidas como celulases, endo  $\beta$ -1,4 glicanases e carboximetilcelulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina),  $\beta$  glicana e xilana (MAGALHÃES, 2005).

Celulose beta-1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91), conhecida também como exoglucanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -1,4 celobiohidrolase ou Avicelase são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias (ABADULLA *et al.*, 2000; COUTO *et al.*, 2004; MARTINS, 2005).

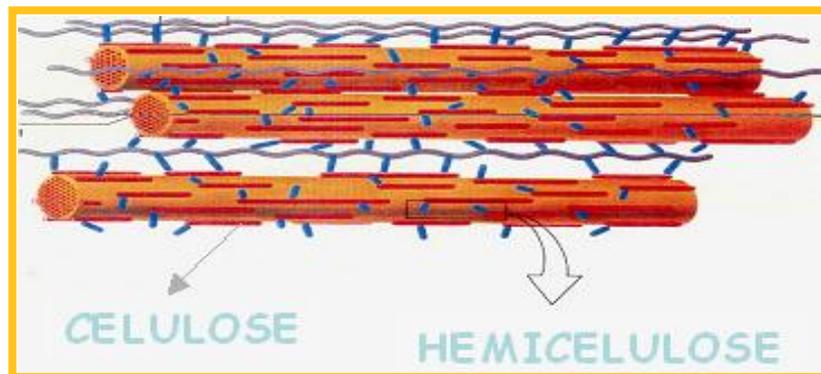
A produção da enzima endo  $\beta$ -1,4 xilanase também tem um papel importante nas indústrias de papel e celulose, uma vez que o seu uso reduz a utilização de substâncias organocloradas na etapa de biobranqueamento das polpas kraft. A ruptura de ligações de hemicelulose faz com que a polpa apresente uma estrutura mais flexível, facilitando a remoção da lignina e contribuindo, por conseguinte, com a redução do consumo de cloro nos vários estágios de branqueamento (LACAZ, 2002; MAGALHÃES, 2005).

### **2.3 Xilano**

Os micro-organismos são fontes promissoras de enzimas, pois na natureza eles têm a capacidade de degradar enzimaticamente diferentes substratos, dentre estes a celulose bem como a hemicelulose, através da produção de um complexo sistema enzimático, nas quais estas enzimas.

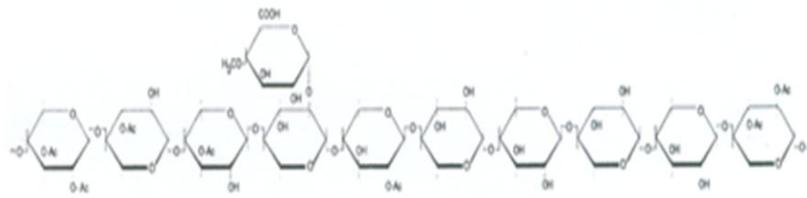
sinergisticamente podem levar a degradação total destes carboidratos, gerando produtos diversificados com grandes aplicações industriais.

O xilano é o principal polissacarídeo constituinte do complexo hemicelulósico, presente principalmente nas paredes celulares dos vegetais (Figura 2). São encontrados em diferentes tipos de vegetais, como madeiras duras, correspondendo de 15 a 30 % da parede celular, madeiras macias, correspondendo de 7 a 10 % e também em algas (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

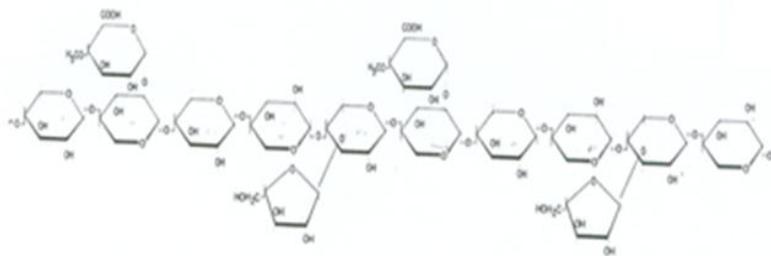


**Figura 2-** Esquema da composição da parede celular dos vegetais

Xilanos de diferentes origens são distinguidos por composição, tipos de ramificação e graus de polimerização, proporcionando, portanto, diferentes propriedades físicas e químicas. Os xilanos de madeiras duras possuem uma estrutura linear com aproximadamente 200 resíduos de xilopiranoses, contendo de 3 a 5% de glucomananas com glicose e manose (Figura 3). Em contrapartida, os xilanos de madeiras macias são mais curtos e ramificados, contendo pelo menos dois tipos de galactoglucomananas e resíduos de D-glicopiranosose (Figura 4) (POLIZELI et al., 2005; SILVA, 2006).



**Figura 3** – Estrutura de xilano representado em madeiras duras



**Figura 4** – Estrutura de xilano representado em madeiras macias

Devido a complexidade dos diferentes tipos de xilanos presentes na natureza, sua degradação requer uma diversidade considerável de enzimas xilanolíticas com diferentes especificidades, características físicas, químicas e bioquímicas bastante distintas (POLIZELI *et al.*, 2005).

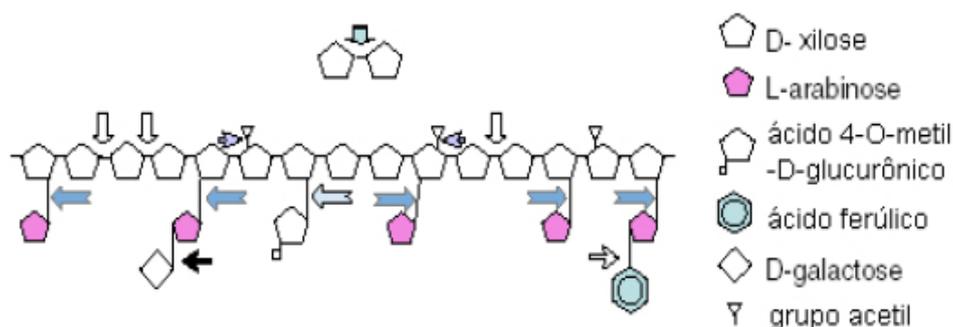
Nas últimas décadas, o interesse industrial por enzimas fúngicas de fontes extracelulares que promovem a degradação da xilana tem crescido. A hidrólise do xilano tem aplicações na indústria de alimentos, como substitutos da gordura, como um aditivo anticongelante, e também na indústria farmacêutica. Com a hidrólise, os monossacarídeos gerados a partir do xilano também podem ser convertidos em combustível líquido, proteínas isoladas de células, solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria (MAGALHÃES, 2009).

## 2.4 Xilanase

Na natureza, o xilano é completamente hidrolizado por uma ação sinérgica de diversas enzimas, ou seja, de um complexo enzimático xilanolítico incluindo principalmente  $\beta$ -1,4 D- xilanases e  $\beta$ -D-xilobiose (MEDEIROS, 2007)

As xilanases são glucanases capazes de catalisar a hidrólise do xilano e devido à sua estrutura heterogênea demandam complexo xilanolítico para sua total degradação e não apenas uma enzima. Os componentes desse sistema que têm sido mais extensivamente estudados são as endoxilanases e as  $\beta$ -xilosidases. Dependendo de sua origem biológica, uma ou mais isoformas de endo-1,4- $\beta$ -xilosidase (1,4- $\beta$ -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) clivam o xilano aleatoriamente em suas ligações  $\beta$ -1,4 em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose. Já a  $\beta$ -xilosidase ( $\beta$ - D-xilosídeo-xilohidrolase, EC 3.2.1-37) hidroliza xilobiose e pequenos xilo-oligossacarídeos em regiões não-redutoras até xilose. Endo-xilanases, os maiores componentes do sistema xilanolítico de microrganismos, têm sua ação facilitada por enzimas acessórias que removem as ramificações da cadeia do xilano como a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase, acetilxilano esterase e ácido felúrico esterase, entre outras.

Um esquema da hidrólise do xilano está representado na Figura 5 (ZANOELO *et al.*,2004; POLIZELI *et al.*, 2005; COLLINS, GERDAY e FELLER, 2005).



SÍMBOLO	ENZIMA	EC	LIGAÇÃO HIDROLISADA
↓	Endo-1,4-β-xilanase	3.2.1.8	β-1,4
↘	β-D-xilosidase	3.2.1.37	β-1,4
→	α-L-arabinofuranosidase Arabinoxilano arabinofurano-hidrolase	3.2.1.55	α-L-1,2; α-L-1,3 e α-L-1,5
⇌	α-D-glucuronidase	3.2.1	α-1,2
⇒	feruloil esterase	3.2.1	éster
→	α-D-galactosidase	3.2.1.22	α-1,6
⇌	acetilxilano esterase	3.1.1.6	éster

**Figura 5** – Esquema da degradação completa de arabinoxilano, apresentando as enzimas envolvidas no processo (ARO et al., 2005)

Xilanases já foram purificadas de numerosos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Endo-xilanases de fungos têm pesos moleculares na faixa de 7 a 60 kDa e são geralmente mais ativas em pH entre 3,5 e 6,0 e temperatura de 40-60°C (BAILEY *et al.*, 1991).

As xilanases apresentam características diferentes, como pH e temperatura ótimos de atuação, e especificidade pelo substrato, dependendo do microrganismo produtor (HALTRICH *et al.*, 1996).

De uma maneira geral, as xilanases, provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo, no entanto, a melhor produção enzimática obtida em pH entre 4 e 7 (SILVA, 2006).

## 2.5 Aplicação Comercial de Xilanases

Todo interesse no estudo dos sistemas de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos, por isso estudos de caracterização enzimática, tais como termoestabilidade e pH ótimo destas enzimas são particularmente importantes.

A aplicação das xilanases divide-se em duas categorias, segundo Biely (1985): uma associada a polissacaridases (por exemplo, celulases) e outra livre de celulase.

Xilanases associadas a polissacaridases têm sido usadas na clarificação de sucos e vinhos, fabricação de pães e na etapa da filtração da cerveja rompendo sólido em suspensão (HAROS; ROSELL; BENEDITO, 2002; BUTT *et al.*, 2008).

No processamento de sucos, frutas e vegetais, a ação combinada das xilanases, celulases, pectinases e outras hemicelulases apresentam um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final (LIMA *et al.*, 2005).

Na indústria de panificação as xilanases vêm sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam de 2 a 3% (p/p) da farinha de trigo. Estes compostos absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim, o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases (arabinosidases) à farinha leva à liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume e melhor estrutura de miolo (SAPAG *et al.*, 2002; BUTT *et al.*, 2008).

Xilanases adicionadas à ração de aves e suínos aumentaram sua digestibilidade. A aplicação de xilanases, diretamente sobre a estrutura da xilana, leva à remoção seletiva da hemicelulose e também à obtenção de produtos como xilose e xilo-oligômeros, que apresentam potencialidade de aplicação direta como padrões para cromatografia ou na indústria de alimentos, como espessantes, substituintes de gordura e aditivos anti-congelantes. Além disto, estes compostos podem, ainda, ser convertidos, química ou

biologicamente, em combustíveis líquidos, solventes e edulcorantes de baixas calorias, como por exemplo, o xilitol (KANG, 2004).

Têm-se, ainda, relatos da aplicação de xilanases na extração de café, de amido, de flavorizantes, de pigmentos e de óleos (KULKARNI et al., 1999; MOSIER, 2005; MACIEL, 2006).

Uma das maiores aplicações da xilanase, livre de celulase, está relacionada às indústrias de celulose e papel. O biobranqueamento da polpa por xilanases, em substituição ao cloro, promove a remoção da xilana ligada ao complexo lignina-carboidrato facilitando a lixiviação da lignina. Por outro lado, o tratamento do material com xilanase na fase de pré-cozimento ajuda a desorganizar a estrutura da parede celular, facilitando, também, as etapas iniciais do processo (GOMES, 2007).

Desde que a madeira usada para produção de polpa é tratada a altas temperaturas (acima de 70 °C) e em pH alcalino, a etapa enzimática requer enzimas termoestáveis, com alta estabilidade e atividade em pH alcalino. Além disso, é necessário que o preparado enzimático seja livre de celulases, para evitar o ataque às fibras de celulose, tenha xilanases muito ativas, para reduzir o custo, e com baixo peso molecular, para facilitar sua difusão na polpa (TCHAPUN, 2003).

As xilanases comerciais como as Pulpzyme e Cartazyme não são termoestáveis o suficiente (atividade ótima 50–60 °C e mantêm 50% de sua atividade por 15 min a 55 °C) para evitar a necessidade de um resfriamento da polpa após o tratamento alcalino. Vários trabalhos têm relatado a produção de xilanases alcalinas e termoestáveis por organismos termófilos e hipertermófilos, procariotos e eucariotos. As atividades das xilanases termoestáveis descritas têm variado de 60 a 100 °C (PALACKAL, 2004; GOMES, 2007).

Nesta aplicação, as xilanases podem auxiliar, consideravelmente, na redução da poluição ambiental, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que resulta na formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente. Em função dos efeitos biológicos diretos em ecossistemas aquáticos de efluentes de branqueamento à base de cloro, existem, hoje, especialmente na América do Norte e Europa Ocidental, sérias restrições ao

uso dos compostos clorados nos processos de branqueamento (SILVA, 2006; LO *et al.*, 2009).

A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente, aproximadamente 90%, é de origem microbiana (FELIX *et al.*, 2004). A escolha da utilização de enzimas microbianas deve-se a maior facilidade de obtenção em relação a enzimas de vegetais e animais e também as diferentes características de enzimas secretadas pelos microrganismos.

Neste contexto, as enzimas têm desempenhado um papel central na biotecnologia, sendo utilizadas em processos industriais para aumentar a especificidade e eficiência de processos, melhorando a pureza e reduzindo os gastos com compostos químicos e os impactos ambientais. As hidrolases são enzimas que catalisam reações de hidrólise (ocorrendo a transferência de grupos funcionais para a água). Dentre estas, as xilanases são enzimas que têm sido usadas em muitas aplicações biotecnológicas.

## **2.6 Xilanases Fungicas**

Dentre os microrganismos com potencial para aplicações biotecnológicas, os fungos vêm despertando interesse, devido à grande diversidade de enzimas que secretam no ambiente, sendo responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais. Esses microrganismos desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos (SILVA, 2006).

Sob o ponto de vista industrial, a importância dos fungos para a produção e comercialização de enzimas está na facilidade das mesmas, uma vez produzidas, de serem extraídas, sem a necessidade de haver ruptura celular (HALTRICH *et al.*, 1996).

Atualmente, devido à diversidade tanto de microrganismos quanto de enzimas, muitas são as áreas da pesquisa que envolvem a produção de enzimas hidrolíticas em larga escala para fins industriais. Dentro deste contexto estão as xilanases, enzimas que podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, incluindo os fungos filamentosos, que se destacam como principais produtores (PHAN *et al.* 1998).

A produção de xilanases em escala industrial é, atualmente, dominada por espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH *et al.*, 1996; PHAN *et al.*, 1998). As xilanases já foram encontradas e purificadas a partir de vários fungos filamentosos, podendo-se citar os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Talaromyces*, entre outros (PANDEY, 1999; KHENG, 2005).

A xilanase, do *Trichoderma logibrachiatum*, atua rompendo as paredes celulares da fibra possibilitando maior capacidade de ação das enzimas amilase e protease sobre os xilo-oligômeros liberados (ZANELLA, 1998; GIACOMETTI, 2002). Uma das principais características desta enzima é seu perfil amplo de atuação em pH de 3,5 a 6,5, que permite sua utilização em rações por agir ao longo do trato gastrointestinal até o final do íleo (ZANELLA, 1998). O emprego de xilanase foi demonstrado em dietas de frangos à base de trigo, cevada, milho e sorgo, tendo como destaque nutricional a redução da viscosidade do bolo alimentar no lúmen intestinal (OUHIDA *et al.*, 2000).

Espécies de *Pleurotus* são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulases,  $\beta$ -glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (PALMIERI *et al.*, 2000; QINNGHE *et al.*, 2004). Estes fungos formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes maiores de resíduos lignocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (SHISHIDO, 1992). Muitos destes microrganismos são capazes de produzir enzimas hidrolíticas para a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o metabolismo. Essas enzimas agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo, destacando-se: celobiohidrolases, endoglucanases, beta-glucosidases e xilanases (VALASKOVÁ & BALDRIAN, 2006).

Mediante a grande variedade de espécies de fungos presentes no meio ambiente, muitos ainda não estudados, o potencial fúngico para produção de xilanase e a vasta biomassa, disponível a baixos custos de produção tornam os resíduos lignocelulósicos uma fonte de matéria renovável, de grande valor

biotecnológico. Grandes quantidades são geradas e desprezadas nas práticas agrícolas, na indústria de polpa e papel, indústria madeireira e agroindústrias levando à poluição ambiental. Torna-se necessária a busca de novos microrganismos e novos estudos enzimáticos visando um eficiente reaproveitamento desses materiais orgânicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O desenvolvimento metodológico do trabalho foi dividido em três etapas consecutivas. A primeira etapa envolveu a otimização do crescimento do fungo, onde foram avaliados parâmetros como: meios de cultura, pH e temperatura; na segunda etapa foi estudada a produção do complexo enzimático e purificação parcial da principal enzima excretada por *P. sanguineus* em meio líquido de malte e na terceira etapa foi caracterizada a enzima xilanase parcialmente purificada.

#### **1ª etapa**

##### **3.1 Microrganismos**

Foram utilizadas amostras dos fungos *Pycnoporus sanguineus*, obtidas a partir de coletas realizadas na área rural do Município de Parintins/AM. O estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e nos laboratórios de Fermentação, Proteoma e DNA do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

##### **3.2 Meio de Cultura para Otimização Fúngica**

Para efetuar a inoculação do material fúngico foi utilizada a metodologia proposta por BETTUCCI & GUERRERO (1971), onde é necessário aquecer um estilete, molhar na água destilada e cortar amostras sempre próximas à chama do bico de Bunsen, verter o meio em placa de Petri casadas e vedadas com fita crepe, sendo que este procedimento foi executado utilizando uma câmara de fluxo laminar vertical e bico de Bunsen para diminuir a possibilidade de contaminação.

Cada amostra de fungo (3cm) utilizada para inoculação passou por procedimentos de assepsia, que consta das seguintes etapas:

- 1- Mergulhar a amostra por 1 segundo em álcool 70%;
- 2- Em seguida, mergulhar também por 1 segundo, em hipoclorito de sódio a 3%;
- 3- Deixar imerso por 1 minuto em água destilada;
- 4- Colocar sobre papel filtro para absorver o líquido e secar amostra.
- 5- Inocular em placas casadas, vedadas com identificação.

Seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), a inoculação do fungo ocorreu em meio malte, Agar sabouraud, sabouraud acrescido de 2% de glicose e sabouraud acrescido de 2% de peptona, todos acrescidos de cloranfenicol e/ou ampicilina, para minimizar contaminação. As culturas foram mantidas em incubadora com temperaturas de, 25, 30, 35 e 40°C e pHs iniciais para meios ácidos ou alcalinos, na escala de 4, 5, 6 e 7, usando-se hidróxido de sódio (NaOH) 1,0M e/ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1,0M.

### **3.3 Otimização de pH e Temperatura**

Para otimizar o crescimento do fungo nos meios sólidos de Agar Sabouraud 4% e Malte, utilizou-se a metodologia proposta por Castro e Silva (1996). Para cada amostra fúngica foram realizados repiques em meios com pH inicial de 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40°C), avaliando simultaneamente as duas variáveis. Ressaltando que no que diz respeito ao pH, o reajuste para cada caso foi realizado com NaOH 1,0 M ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 M. Para evitar a degradação do Agar abaixo de pH 5,0 o ajuste foi feito após a autoclavagem. Posteriormente as placas foram inoculadas e o crescimento ocorreu em temperatura ambiente e em incubadora.

### **3.4 Quantificação do Crescimento Fúngico**

Para quantificar o crescimento fúngico nos meios sólidos de Agar Sabouraud 4% e Malte, foi utilizado o método da placa de Petri e mensurada a progressão da fronteira micelial contra o tempo, como propõe a metodologia baseada em BETTUCCI & GUERRERO (1971). A progressão da fronteira micelial foi acompanhada através de medição diária do aumento do diâmetro da colônia em função do tempo, durante um período de sete dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## **2ª Etapa**

### **3.5 Produção do complexo enzimático e purificação parcial da principal enzima excretada por *P. sanguineus* em meio líquido de malte**

#### **3.5.1 Otimização do tempo de cultivo para a produção do complexo enzimático**

Cinco discos de 0,9 cm de diâmetros de *P. sanguineus* com 8 dias de cultivo em meio sólido de malte, foram inoculados em 200 mL de meio líquido de malte contendo ou não 2% de glicose como fonte de carbono. As culturas foram incubadas por 10 dias sob agitação a 120 rpm à 30°C. Foram retiradas alíquotas de 2mL do meio fermentativo a cada 48 horas, as quais foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 g, para posteriores dosagens enzimáticas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Durante o período de cultivo foram investigadas as seguintes enzimas: xilanase,  $\beta$ -Xilosidase e  $\beta$ -Glicosidase.

#### **3.5.2 Atividade Xilanase**

A atividade xilanólítica foi determinada por meio da incubação de 50  $\mu$ L do filtrado de cultura com 75  $\mu$ L de solução de xilano a 1%, dissolvido em tampão acetato pH 6,5 50 mM, por 10 minutos a 50 °C, formando o complexo enzima/substrato. A reação foi interrompida pela adição de 125  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), deixando por cinco minutos em banho fervente. Posteriormente adicionou-se 1,0 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita segundo Miller (1959) utilizando xilose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de xilose por minuto por mL.

### 3.5.3 Atividade $\beta$ -Xilosidase

Para determinar a atividade da  $\beta$ -Xilosidase utilizou-se a metodologia descrita por Tan *et al.*,(1987). O método consiste em utilizar *p*-nitrofenil- $\beta$ -Xilopiranosídeo (pNPX) como substrato para determinação da atividade  $\beta$ -Xilosidase . Para a referida dosagem incubou-se 20 $\mu$ L do complexo enzimático em 80  $\mu$ L de uma solução 0,2% (p/v) de pNPX, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), a 50°C durante 10 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu$ L de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. A liberação de *p*-nitrofenil foi mensurada no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade internacional (IU) de atividade de  $\beta$ -xilosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de *p*-nitrofenil por minuto sob as condições de ensaio.

### 3.5.4. Atividade da $\beta$ -Glicosidase

Para determinar a atividade da  $\beta$ -glicosidase utilizou-se a metodologia descrita por Tan *et al.*,(1987). O método consiste em utilizar *p*-nitrofenil- $\beta$ -glicopiranosídeo (pNPG) como substrato para determinação da atividade  $\beta$ -glicosidase. Para a referida dosagem incubou-se 20 $\mu$ L do complexo enzimático em 80  $\mu$ L de uma solução 0,2% (p/v) de pNPG, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), a 50°C durante 10 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu$ L de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. A liberação de *p*-nitrofenil foi mensurada no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade internacional (IU) de atividade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de *p*-nitrofenil por minuto sob as condições de ensaio.

No dia de cultivo em que o fungo *P. sanguineus* excretou em meio líquido malte maiores atividades enzimática das enzimas citadas acima (xilanase,  $\beta$ -

xilosidase e  $\beta$ -glicosidase) , investigou-se a atividades das seguintes enzimas: CMCase, avicelase e lacase.

### **3.5.5. Atividade de CMCase**

A atividade CMCásica foi determinada por meio da incubação de 50  $\mu$ L do filtrado de cultura com 75  $\mu$ L de solução de carboximetilcelulose a 1%, dissolvido em tampão acetato pH 6,5 50 mM, por 30 minutos a 50 °C, formando o complexo enzima/substrato. A reação foi interrompida pela adição de 125  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), deixando por cinco minutos em banho fervente. Posteriormente adicionou-se 1,0 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita segundo Miller (1959) utilizando glicose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de glicose por minuto por mL.

### **3.5.6 Atividade de Avicelase**

A atividade Avicelásica foi determinada por meio da incubação de 50  $\mu$ L do filtrado de cultura com 75  $\mu$ L de solução de avicel a 1%, dissolvido em tampão acetato pH 6,5 50 mM, por 30 minutos a 50 °C, formando o complexo enzima/substrato. A reação foi interrompida pela adição de 125  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), deixando por cinco minutos em banho fervente. Posteriormente adicionou-se 1,0 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda a 540 nm. A determinação de açúcares redutores foi feita segundo Miller (1959) utilizando glicose como padrão, onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu$ mol de glicose por minuto por mL.

### **3.5.7 Atividade de Lacase**

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se ABTS como substrato enzimático (SZKLARZ et al., 1989). A oxidação do ABTS foi acompanhada por 3 minutos a 420 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de complexo enzimático, 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), e 0,1 mL de ABTS 1,0mM.

### **3.5.8 Determinação de Proteínas**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se brancos apropriados.

Dentre todas as enzimas investigadas o complexo xilanolítico mostrou-se mais promissor. Avaliaram-se os seguintes parâmetros na produção do referido complexo.

### **3.5.9 Cinética da produção de Xilanase**

A cinética da produção do complexo xilanolítico de *P. sanguineus* foi estudada de forma estacionária e com agitação de 120 rpm, em meio líquido de Malte, utilizando-se glicose como fonte de carbono, para verificar a influência do tempo de cultivo e da agitação nesse processo. O crescimento e a produção enzimática foram avaliados por meio da dosagem de proteínas extracelulares.

### **3.5.10 Influência da Temperatura e do pH sobre a produção de Xilanase**

A determinação da influência do pH sobre a produção de Xilanase foi verificada por meio do cultivo de *P. sanguineus* em meio líquido de Malte, contendo glicose como fonte de carbono por 8 dias em agitação de 120 rpm a 28 °C, em pHs de 4,0 a 9,0, com variações de 0,5 unidade, utilizando diferentes tampões. O pH foi ajustado pela adição de solução de hidróxido de sódio ou

ácido acético. Para o estabelecimento da temperatura mais apropriada a produção de Xilanase foi verificada em temperaturas específicas, de 25 a 35°C, com intervalos de 5 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas (AYUB, 2005).

Como próxima etapa do referido trabalho purificou-se e caracterizou-se parcialmente a enzima xilanase excretada por *P. sanguineus* em meio líquido de malte.

### **3.5.11 Purificação Parcial de xilanases.**

O filtrado de cultura (200 mL), obtido nas condições otimizadas nas etapas anteriores, foi precipitado a 70% de sulfato de amônia. Posteriormente centrifugado por 60 minutos a 4°C e rotação de 4 000 rpm. O precipitado foi ressuspenso em 2mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4. As frações de sobrenadante e precipitado foram submetidas às dosagens de atividade xilanolítica e proteínas totais solúveis. Um mL da fração precipitada na qual detectou-se atividade xilanolítica, foi filtrado utilizando um filtro Millex GV 0,22µm (durapore PYDF Membrane) e posteriormente injetada em um cromatógrafo tipo AKTA Purifier UPC 900, sistema UNICORN 5.11; utilizando uma coluna de troca aniônica HiTrap SP XL, capacidade 1mL, previamente equilibrada no tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 1 mL/min e a eluição foi realizada com gradiente linear de 0,0 a 1,0 M de cloreto de sódio, no mesmo tampão. Frações de 2,0 mL/tubo foram coletadas, sendo estas monitoradas pelo programa do cromatógrafo em absorbância de 280 nm e submetidas às determinações de atividade xilanase (conforme descrito no item 3.5.2). O índice de pureza, das frações que apresentaram atividade xilanase, bem como seus perfis protéicos, foram analisadas eletroforéticamente em PAGE-SDS (metodologia descrita no item 3.5.12). As frações que apresentaram atividades xilanases com mesmo perfil protéico, foram reunidas e submetidas aos ensaios de caracterização.

### 3.5.12 PAGE-SDS

O perfil de proteínas e o grau de pureza obtido durante as etapas de purificação foram avaliados através de gel de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes (PAGE-SDS), segundo Laemmli (1970). As amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em tampão de amostra desnaturante (tampão Tris-HCl 1M pH 6,8;  $\beta$ -Mercaptoetanol 1% v/v; SDS 0,4 % (p/v); Glicerol 10% v/v e azul de bromofenol 0,02% p/v), fervidas por 5 min e aplicadas no gel. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente, com uma voltagem inicial de 50 V durante a corrida no gel concentrador e depois de 100 V até o final da corrida eletroforética.

Os padrões de proteína utilizados para estimar a massa molar da enzima xilanase em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS/ Page Ruber <sup>TM</sup> Prestrained Protein Ladder # SM 0671), tinham as seguintes massas: 170 KDa, 130 KDa, 95KDa, 72 KDa, 55 KDa, 43 KDa, 34 KDa, 26 KDa, 17 KDa e 10 KDa.

### 3.5.13 Coloração com nitrato de prata

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado para proteínas, utilizando-se o método de coloração descrito por Blum e colaboradores (1987), modificado. O gel foi colocado em 100 mL de uma solução fixadora (metanol p.a. 50% (v/v), ácido acético p.a. 12% (v/v), por 30 segundos. Foram realizadas lavagens de 15 segundos em 100 mL de etanol 30%, em 100 mL de solução de tiosulfato de sódio e 100 mL de água destilada, esta última por 2 vezes consecutivas. Em seguida, o gel foi incubado em 100 mL de uma solução de prata 0,2% (p/v), contendo 0,1% de formaldeído (v/v) por 15 segundos, no microondas; e finalmente o gel foi colocado na solução reveladora (48 mL de carbonato de sódio, 50  $\mu$ l de formaldeído e 2 mL de tiosulfato de sódio a 0,02 % (p/v), até o aparecimento das bandas de proteína. A coloração foi interrompida por meio de uma solução contendo metanol p.a. 50% (v/v) e ácido acético p.a. 12% (v/v). Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

### **3ª Etapa**

#### **3.6 Caracterização de Xilanase parcialmente purificada**

##### **3.6.1 Determinação do pH e temperatura ótima**

A determinação do pH ótimo da enzima parcialmente purificada foi realizada através do ensaio enzimático definido no item 3.5.2, em diferentes valores de pH (4,5 a 8,8) a 50°C, utilizando-se tampão McIlvaine.

A temperatura ótima da enzima parcialmente purificada foi determinada incubando-se a mistura de reação em diferentes temperaturas, conforme descrito no item 3.5.2, utilizando-se tampão fosfato 50 mM pH 8,0 na faixa de 20 a 60 °C.

##### **3.6.2 Determinação da estabilidade térmica**

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação das enzimas parcialmente purificadas a 50, 60, 65, 75 e 85°C por 0, 5, 10, 20, 30, 60 e 90 min na ausência de substrato. As amostras foram então retiradas, sendo determinada a atividade residual.

##### **3.6.3 Determinação da estabilidade de xilanase parcialmente purificada em diferentes pHs.**

A metodologia utilizada para avaliar a estabilidade em diferentes pHs da enzima parcialmente purificada foi realizada com amostras preparadas na proporção de 1:1, enzima:tampão (v/v), em diferentes pHs utilizando-se tampão McIlvaine de 3,0 a 8,8. Após 24h, 48h e 72h de incubação a temperatura ambiente (25 °C) foi determinada a atividade xilanase residual.

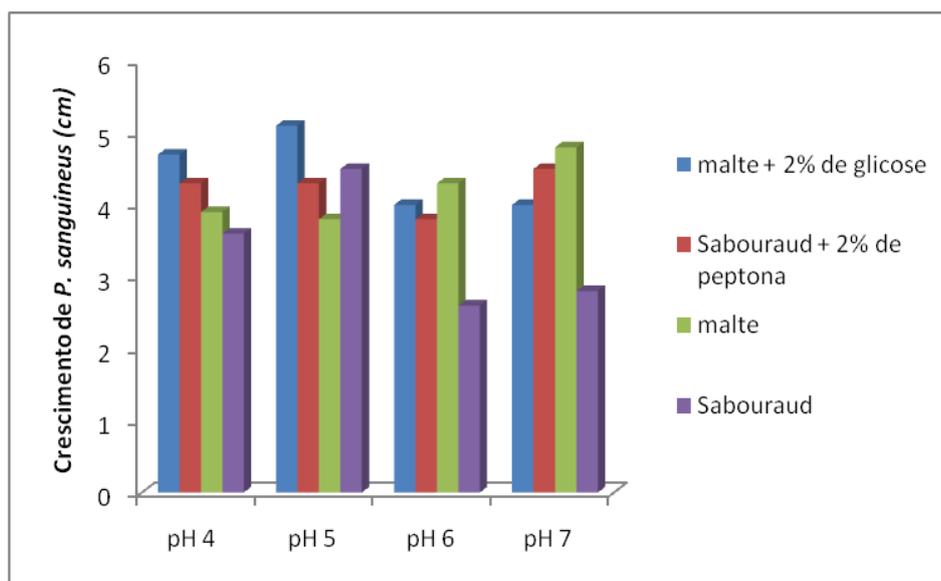
#### **3.6.4 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes.**

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade xilanase foi avaliado incubando-se as enzimas em diferentes concentrações de xilano de birchwood (2,0 a 50 mg/mL), sendo determinada a atividade xilanase conforme descrito no item 3.5.2. As constantes Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e as velocidades máximas de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) aparentes, foram estimadas conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934). Os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições e a reta foi calculada por regressão linear, a partir das médias dos valores obtidos em cada experimento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Influência do meio e pH no crescimento de *P. sanguineus*

Para otimizar o crescimento do *P. sanguineus*, isolado da região rural do Município de Parintins/ AM, foram testados diferentes meios sólidos (malte, sabouraud, sabouraud acrescido de 2% de glicose e sabouraud acrescido de 2% de peptona ) em diferentes pHs, conforme podemos detectar na Figura 6. Em todas as faixas de pHs estudadas, o meio sabouraud apresentou um menor avanço da fronteira micelial, no período estipulado do experimento (8 dias). Entretanto, o maior avanço da fronteira micelial ocorreu neste meio quando acrescido de glicose e ajustado para o pH 5, diminuindo gradativamente à medida que aumentamos o pH. Este resultado está de acordo com aquele apresentado por Ferreira (2005) para diferentes cepas desse fungo.



**Figura 06:** Crescimento micelial do *P. sanguineus* em diferentes meios de cultura e pH a temperatura ambiente.

Com o objetivo de verificar se existe diferença estatística entre os valores detectados nos diferentes pH realizou-se o teste estatístico ANOVA (Tabela 03) onde ficou evidenciado diferenças de os crescimentos nos diferentes pHs.

**TABELA 03:** ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) COM EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO MICELIAL DO *P. sanguineus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	3	66,85	22,28	3,201	0,00286
Dentro de Tratamentos	68	473,39	6,96		
TOTAL	71				

\* significativo ao nível  $\alpha=0,005$

Teste de Tukey (Tabela 04) para comparação pareada das médias, evidenciou-se diferenças estatística no crescimento do fungo entre os pH 4 e pH 5, enquanto que entre os demais crescimentos não há diferenças estatísticas. Assim, o *P. sanguineus* parece crescer em ambiente ácido à neutro.

**TABELA 04:** TESTE DE TUKEY COM PAREAMENTO DAS MÉDIAS DOS pHs TESTADOS

	{pH4}	{pH5}	{pH6}	{pH7}
	M=2,73	M=5,32	M=4,64	M=4,58
G_1:1 {4}		0.022001 <sup>(*)</sup>	0.140243	0.163279
G_2:2 {5}	0.022001 <sup>(*)</sup>		0.864962	0.829297
G_3:3 {6}	0.140243	0.864962		0.999862
G_4:4 {7}	0.163279	0.829297	0.999862	

(\*) significante a  $p < 0,05$

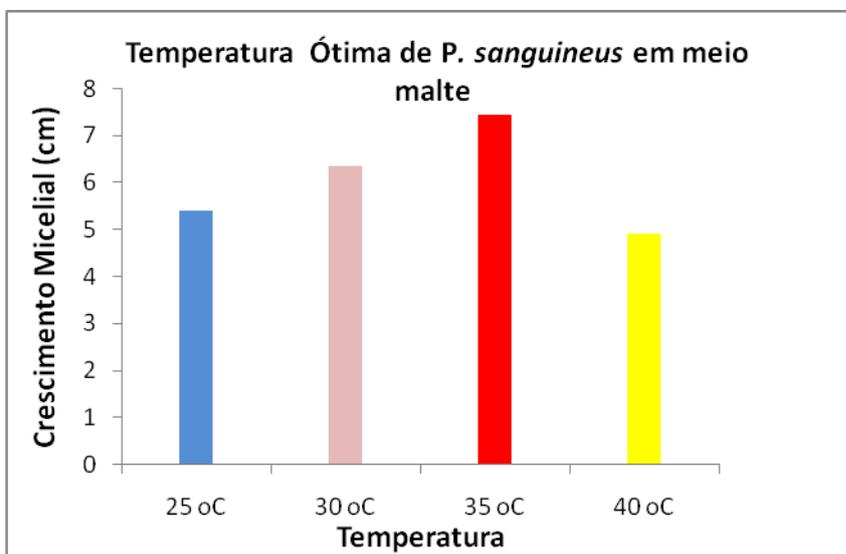
Como é possível observar na figura 04, o fungo desenvolve crescimento significativo nos outros pHs testados, sendo que se evidencia a sua afinidade por ambiente mais ácidos.

#### 4.2 Influência da Temperatura no crescimento de *P. sanguineus*

O estudo da influência de diferentes temperaturas no crescimento micelial do fungo *P. sanguineus*, foi realizada em meio sólido de extrato de malte com 2% de glicose e pH 5,0. Nestas condições, o maior valor médio do crescimento micelial foi obtido na temperatura de 35°C, muito embora, o fungo já apresente crescimento a partir de 25°C (Figura 07).

A 25°C o tempo necessário para o preenchimento total da placa foi de 7 dias e a 40°C foram necessários 8 dias.

Esse resultado corrobora o que observamos durante a coleta desse fungo, onde o aparecimento do corpo frutífero sempre coincidiu com o início do período de alta temperatura (verão) na região (CASTRO E SILVA, *et al.*, 1993; COSTA, 1992).



**Figura 07:** Crescimento micelial do fungo *P. sanguineus* em meio Agar-malte com 2% de glicose, pH 5,0 em diferentes temperaturas.

Há limites de temperatura no qual os processos metabólicos de qualquer organismo fúngico, ou mesmo qualquer forma de vida, pode acontecer. Neste nível, portanto, poder-se-ia afirmar que qualquer mudança fisiológica ou

processo de diferenciação em fungos é dependente da temperatura ou induzido pela temperatura. Entretanto, à parte da dependência básica geral do metabolismo sob temperatura ambiente adequada, instâncias específicas podem ser reconhecidas onde temperatura parece ter um papel adicional como indutor de mudanças em fungos filamentosos (ANDERSON, 1978).

#### 4.3 Otimização do tempo de cultivo para a produção do complexo enzimático de *P. sanguineus*

A Tabela 05 mostra o valor médio da produção enzimática do fungo *P. sanguineus* em meio líquido de malte sem glicose, com e sem agitação (120 rpm), a 30°C por 10 dias de cultivo. O fungo mostrou capacidade de produzir quantidades mensuráveis de enzimas hidrolíticas nas duas condições testadas, Entretanto, na condição sob agitação observou-se melhores valores de atividades enzimáticas testadas para todas as enzimas ensaiadas, detectando aumentos de 46,9% na atividade de  $\beta$ -glucosidase, 55,26% de  $\beta$ -xilosidase e 25,13% na atividade de xilanase.

Comparando-se o crescimento micelial do *P. sanguineus* no meio Agar-malte, considerando-se o pH e temperatura, verifica-se que este último parâmetro é o que exerce maior influência no crescimento micelial desse fungo.

**Tabela 05:** Atividade enzimática do fungo *P. sanguineus* sob condição de agitação e estacionária em meio malte sem acréscimo de glicose como fonte de carbono a 30°C.

ENZIMA	AGITAÇÃO (U/mL)	ESTACIONÁRI (U/mL)
$\beta$ -GLICOSIDASE	7.764	5.287
$\beta$ -XILOSIDASE	3.821	2.461
XILANASE	2.405	1.922

Com o intuito de verificar a influência da glicose na atividade enzimática realizamos teste acrescentando a glicose ao meio líquido como fonte de carbono na condição estacionária (Tabela 06).

**Tabela 06:** Atividade enzimática do *P. sanguineus* com e sem agitação de 120 rpm em meio líquido de malte com e sem acréscimo de glicose.

Enzima	Sob agitação (U/mL)		Sem agitação (U/mL)	
	Com glicose	Sem glicose	Com glicose	Sem glicose
$\beta$ -glicosidase	7,851	7,764	7,251	4,787
$\beta$ -xilosidase	2,551	3,8121	2,551	2,251
Xilanase	2,701	2,405	2,101	1,113

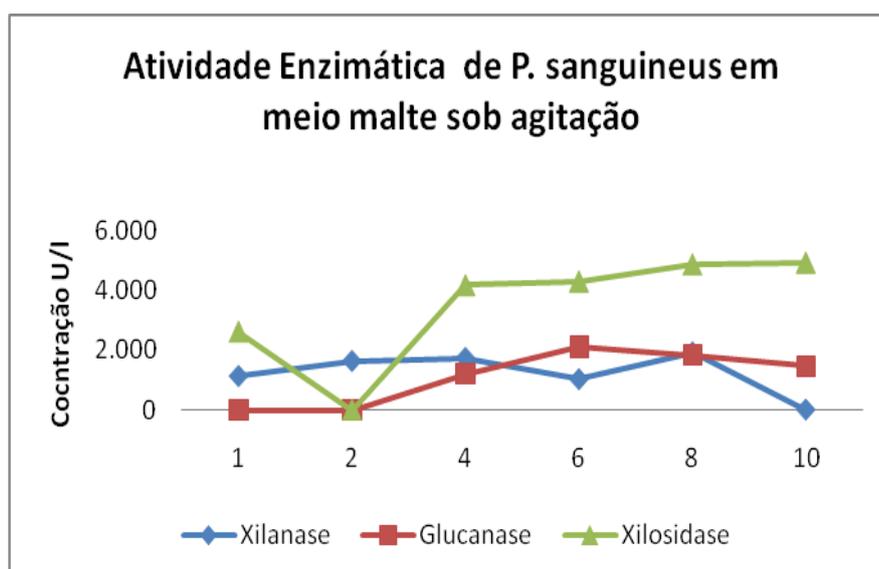
A  $\beta$ -glicosidase, uma enzima produzida em quantidades elevadas pela maioria dos fungos celulolíticos (WOODWARD & WISEMAN, 1982), esteve presente em maior quantidade na condição sob agitação. Ressalta-se, entretanto, que na condição estacionária e presença de glicose no meio de cultura, essa atividade enzimática alcançou patamar similar dessa enzima evidenciando o possível uso da glicose na produção de  $\beta$ -glicosidase.

A produção de  $\beta$ -xilosidase mostrou-se similar na presença e ausência de glicose em crescimento sob condição estacionária. Quando o fungo foi cultivado sob agitação (120 rpm), produziu maior atividade xilosidase, sem a presença de glicose como fonte de carbono. A atividade foi maior aproximadamente 55% quando comparada com a cultura estacionária nas mesmas condições. O *P. sanguineus* foi capaz de produzir xilosidase nos substratos em que ele foi cultivado. Entretanto, a maior atividade ocorreu na condição de agitação sem a presença de glicose, resultado contrário ao obtido por Herrera (1991) para *Thermoascus aurantiacus* com o qual obteve a maior atividade com meio suplementado com 1,5% glicose.

A Xilanase também apresentou maior atividade ao se acrescentar glicose ao meio malte e sob agitação (Tabela 07). Este resultado corrobora

com Pointing et. al, 2000, que afirmam que o crescimento de enzimas de *P. sanguineus* é melhor nas condições de agitação do que na estacionária. A capacidade de fungos que decompõem madeira produzirem xilanases quando crescem em meios que contém glicose como fonte de carbono foi descrita por vários autores (CLEMONT *et al.*, 1970; BAILEY *et al.*, 1971; CASTRO E SILVA *et al.*, 1993).

Posteriormente definidas as condições de cultivo para obtenção do complexo enzimático (sob agitação de 120 rpm na presença de 2% de glicose), estudou-se o melhor tempo para obtenção do referido complexo. A Figura 8 ilustra estes resultados. Para as enzimas  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -xilosidase, obtiveram-se máximo de produção com 6 a 10 dias. Contudo para a xilanase detectou-se um máximo de produção no oitavo dia de cultivo. Neste trabalho definiu-se como sendo o oitavo dia o pico de produção de complexo enzimático excretado por *P. sanguineus* em meio líquido de malte com 2% de glicose, com o intuito de estudar o potencial enzimático do referido fungo na produção de enzimas com grande potencial biotecnológico com aplicação industrial, no extrato enzimático obtido no oitavo dia de cultivo foram investigado a atividades das seguintes enzimas: CMCase, avicelase e lacase, estes dados estão presentes na tabela 7.



**Figura 8:** Cinética de produção do complexo enzimático *P. sanguineus*.

**Tabela 07:** Atividade enzimática de CMCase, avicelase e lacase, em agitação de 120 rpm em meio líquido de malte e com acréscimo de glicose.

ENZIMA	Com agitação 120 rpm (U/mL)
CMCase	-
Avicelase	0.121
Lacase	1.405

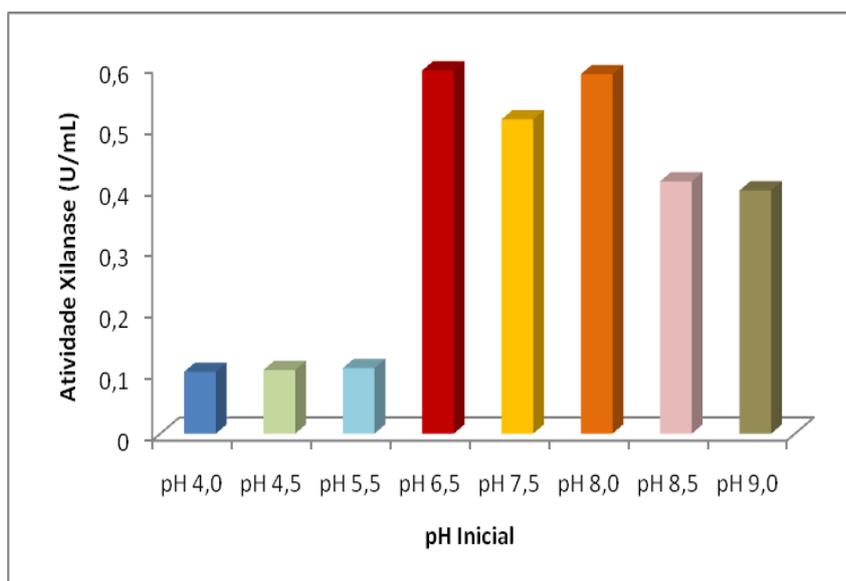
Nas condições de estudos avaliados no presente trabalho, através dos dados obtidos na tabela 7, foi possível detectar que o referido microorganismo não excretou a enzima carboximetilcelulase (CMCase), excretou baixos níveis de avicelases e Lacases, embora esteja descrito na literatura a produção destas enzimas pelo referido fungo estudado.

#### **4.4 Efeito do pH e da temperatura sobre a produção de xilanase excretada por *P. sanguineus***

Nessa etapa, foram estudados os efeitos das variações de pH e temperatura, visando otimizar a produção de xilanase excretada por *P. sanguineus* em cultivo agitado (120 rpm). Para estudo do efeito do pH, a linhagem foi cultivada em meio líquido de Malte acrescido de 2% de glicose com pH ajustado de 4,0 a 9,0, com variações de 0,5 unidade. A Figura 9 ilustra o perfil da atividade enzimática em função dessa variável. Os valores mais altos de atividade xilanase extracelular foram detectados em culturas de pH entre 6,5 a 8,0, sendo observada a maior atividade em pH 6,5. O pH ótimo

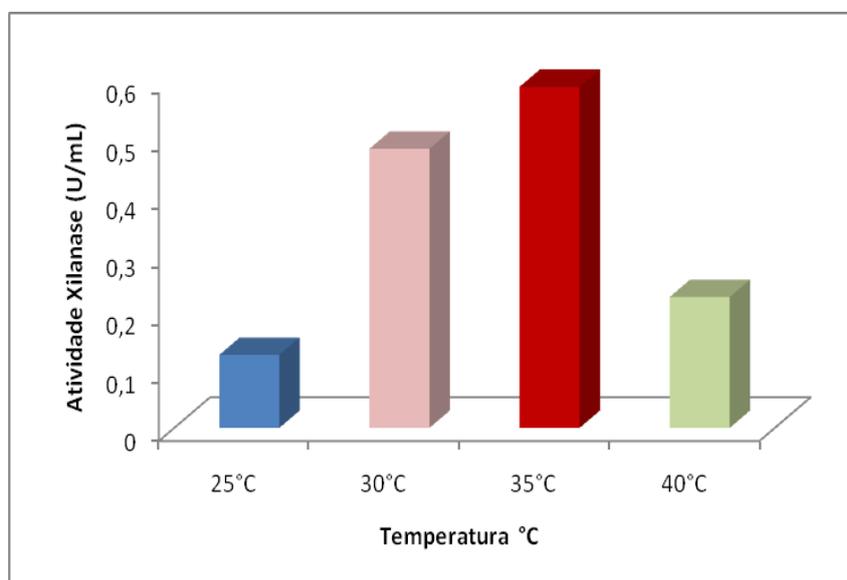
observado para a produção de xilanase por *T. reesei* Rut C-30 (XIONG et al., 2004), foi de 6,0. Coelho e Carmona (2003), obtiveram a maior produção de xilanase por *A. giganteus* em pH inicial 7,0 e Castro e Silva (1993) obteve como pH ótimo o pH 6,5.

Como o pico de atividade extracelular foi obtido em pH 6,5, os experimentos seguintes foram realizados neste pH.



**Figura 9:** Efeito do pH inicial de cultivo sobre a produção de xilanase excretada por *P. sanguineus*. O cultivo foi realizado em meio líquido de Malte com glicose a 2% (m/v), a 35°C e 120 rpm por 8 dias.

O efeito da temperatura sobre a produção de xilanase excretada por *P. sanguineus* foi avaliado em cultivos realizados de 25 a 45 °C, o que está ilustrado na Figura 10. A temperatura entre 30 a 35°C proporcionou a maior produção de xilanase, sendo 35°C a temperatura ótima de produção, verificando-se uma queda na produção desta enzima a 25 e 40 °C. Coelho e Carmona (2003) relataram 25 °C como sendo a temperatura ótima para a produção de xilanases por *A.giganteus*. Para xilanases de *A. versicolor* (CARMONA et al., 1997), 30 °C foi determinada como temperatura ótima de produção.



**Figura 10:** Efeito da Temperatura sobre a produção de xilanase excretada por *P. sanguineus*. O cultivo foi realizado em meio líquido de Malte com glicose a 2% (m/v), pH 6,5 e 120 rpm por 8 dias.

#### 4.5 Purificação parcial da Xilanase excretada por *P. sanguineus*

O complexo xilanolítico excretado por *P. sanguineus*, cultivado nas condições otimizadas de meio líquido de malte com 2% de glicose a 35°C, durante 8 dias de cultivo sob agitação de 120 rpm, produziu um complexo enzimático, do qual foi parcialmente purificada uma xilanase extracelular. A estratégia de purificação utilizada no presente trabalho, visando obter e, posteriormente, caracterizar o principal componente do complexo enzimático excretado por este fungo, consistiu de uma etapa de concentração do complexo por precipitação com 70% de sulfato de amônia, seguida de centrifugação e dosagem enzimática. A atividade xilanolítica foi detectada na fração do precipitado, o qual foi dializado overnight em tampão Tris-HCl 50 mM,

pH 7,4 e posteriormente submetido à purificação utilizando uma cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap SP XL, capacidade 1mL, conforme descrito no item 3.5.11 e Tabela 8.

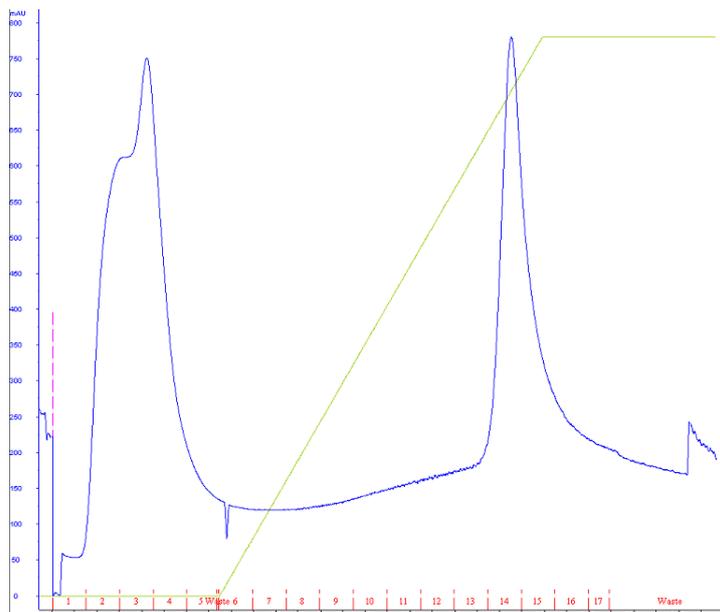
**Tabela 8:** Tabela de purificação parcial de xilanase de *P. sanguineus*.

<b>Etapas da Purificação</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Atividade específica (U/mg de proteína)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Fator de purificação</b>
<b>Complexo enzimático</b>	1,195	0,025	47,8	100	1
<b>Cromatografia Hitrap FF Tris/HCl 50 mM pH 74</b>	4,5	0,009	500,0	11,29	10,46

A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Analisando o perfil protéico presente na Figura 11, é possível detectar a presença de frações com dois comportamentos distintos, as frações iniciais que não interagiram com a resina e as frações que só foram eluídas após a passagem do tampão Tris/HCl acrescido de NaCl (frações que interagiram com a resina). Posteriormente todas as frações foram submetidas a dosagens enzimáticas conforme descrito no item 3.5.2., detectando atividade xilanólítica apenas nas frações 2, 3, e 4, que não interagiram com a resina, correspondendo a 11,29% do extrato bruto, com atividade específica de 500 U/mg de proteína, com fator de purificação correspondente a 10,46. As amostras de enzimas xilanólíticas foram submetidas a PAGE-SDS, para análise do perfil protéico e verificação do índice de pureza. Posteriormente as frações que apresentaram homogeneidade eletroforética foram submetidas aos ensaios de caracterização.

Carmona et al. (2005) utilizaram cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 pH 8,8, como primeira etapa da purificação para obtenção do menor componente presente no complexo xilanólico excretado por *A. versicolor*, o qual correspondeu a 7,9 % do extrato bruto. Silva e Carmona (2006) também utilizaram cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 pH 7,0, como uma das

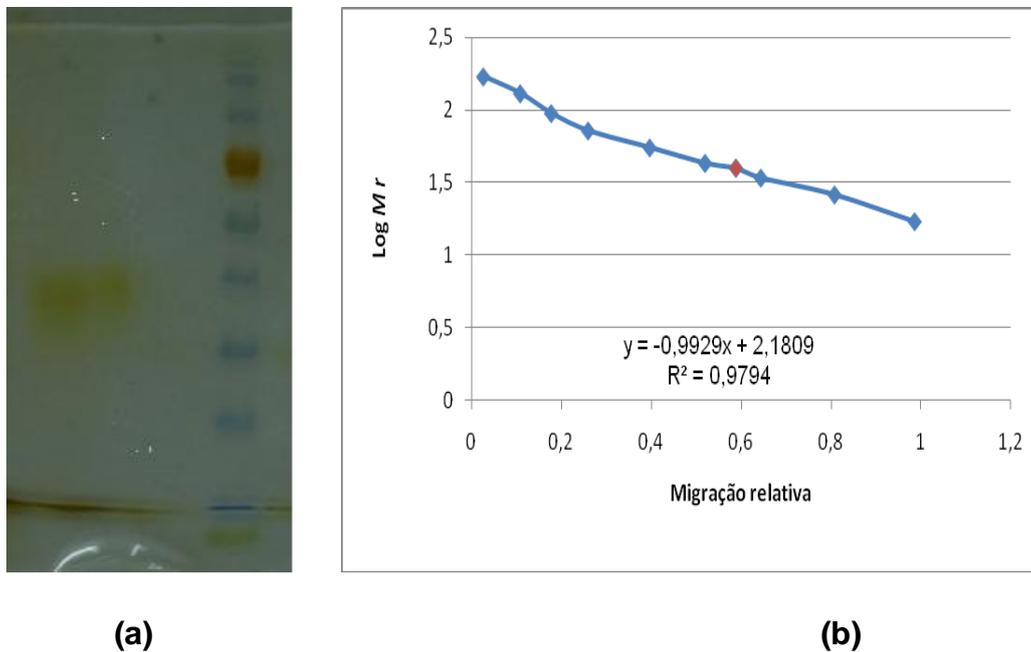
etapas da purificação para obtenção do menor componente presente no complexo xilanolítico excretado por *Trichoderma inhamatum*, o qual correspondeu a 3,73 % do complexo enzimático.



**Figura 11-** Perfil cromatográfico em HiTrap SP XL para a xilanase parcialmente purificada de *P. sanguineus*. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, e eluída com um gradiente salino linear, a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL.

#### 4.6 PAGE-SDS

O perfil de proteínas e o grau de pureza obtido após a cromatografia de troca iônica foi avaliado através de gel de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes (PAGE-SDS). A Figura 12 (a e b) apresenta os perfis eletroforéticos dos padrões e da amostra, os quais revelaram massa molecular de 39,44 kDa para a xilanase de *P. sanguineus* parcialmente purificada no referido trabalho. Tal valor foi reprodutível e é coerente com aqueles descritos na literatura para massas moleculares de xilanases microbianas, que comumente ocorrem entre 8 a 145 kDa (KULKARNI et al., 1999, SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).



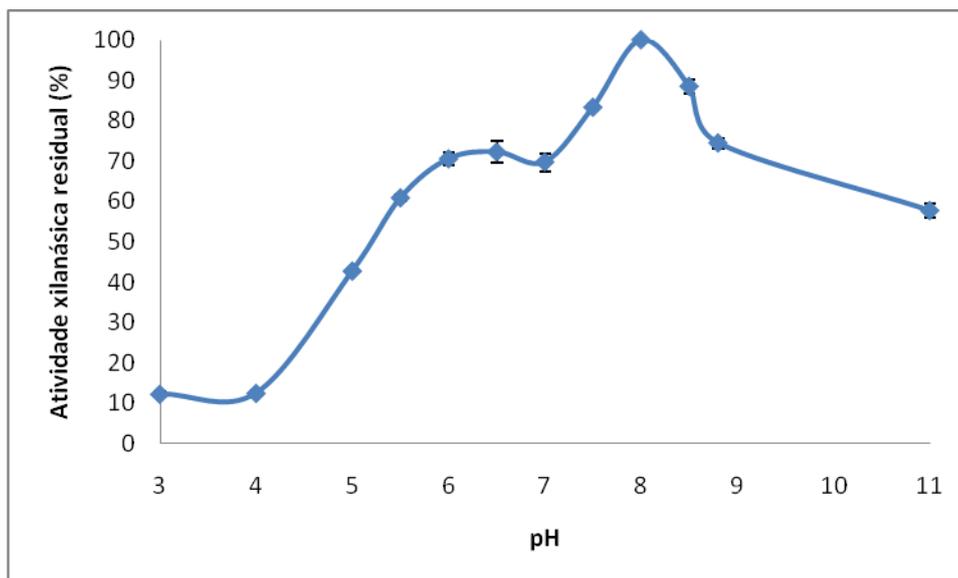
**Figura 12:** Perfil PAGE-SDS em gel 12 % de poliacrilamida, para xilanase de *P. sanguineus*. (a) Da esquerda para a direita: (1) xilanase parcialmente purificada; (2) padrões de massas moleculares: 170,130, 95, 72, 55, 43, 34, 26 e 17 kDa (b) Um gráfico de  $\log Mr$ , das proteínas marcadoras versus a migração relativa durante a eletroforese.

#### 4.7 Caracterização da xilanase parcialmente purificada de *P. sanguineus*.

##### 4.7.1. Temperatura e pH ótimo da xilanasas parcialmente purificada

Para estudo de determinação do pH ótimo da enzima parcialmente purificada foram testados diferentes pHs ajustado de 3,0 a 11,0, os perfis de pH contra a atividade xilanase residual excretada por *Pycnopus sanguineus* estão presentes na Figura 13, no qual podemos detectar na faixa de pH 5,5 a

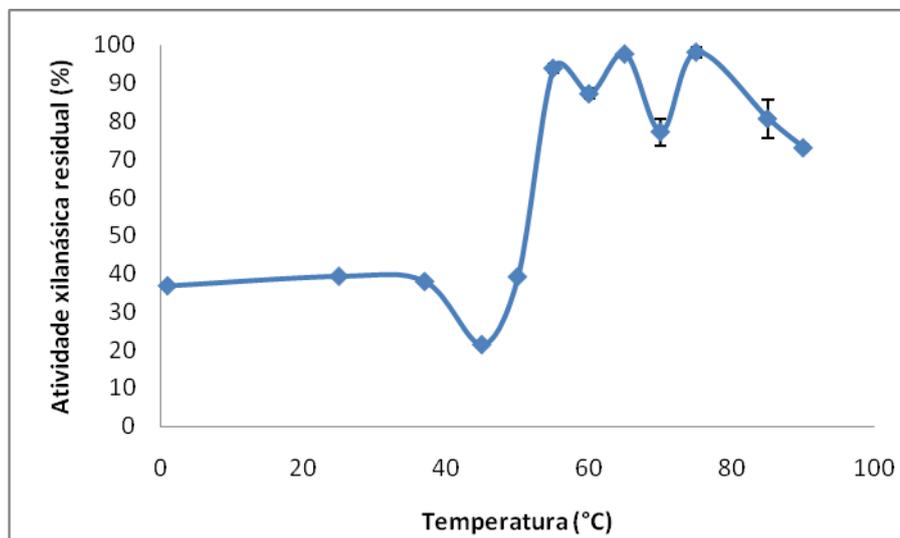
11,0 uma atividade residual superior a 50%. O pH ótimo da referida enzima estudada foi 8,0.



**Figura 13** Efeito do pH sobre as atividades das xilanase parcialmente purificada de *Pycnoporus sanguineus*. No referido ensaio foi utilizada tampão McIlvaine (pH3,0 – 8,0) e tampão glicina NaOH (pH 8,5 a 11,0).

Como o pico de atividade residual foi obtido em pH 8,0, os experimentos seguintes foram realizados neste pH.

O efeito da temperatura sobre a enzima xilanólítica parcialmente purificada foi estudado em temperaturas de 1 a 100 °C, o que está ilustrado na Figura 14. A temperatura de 75 °C proporcionou a maior atividade xilanólítica residual, verificando-se uma queda superior a 50%, na atividade desta enzima nas temperaturas inferiores a 50<sup>0</sup> C. Entretanto em temperaturas superiores a 50°C, detectou-se uma atividade residual superior a 70%. Coelho e Carmona (2003) relataram 25 °C como sendo a temperatura ótima no complexo xilanolítico produzido por *A.giganteus*, Contudo para xilanases de *A. versicolor* (CARMONA et al., 1997) 30°C foi determinada como temperatura ótima.



**Figura 14:** Efeito da temperatura sobre as atividades das xilanase parcialmente purificada de *Pycnoporus sanguineus*.

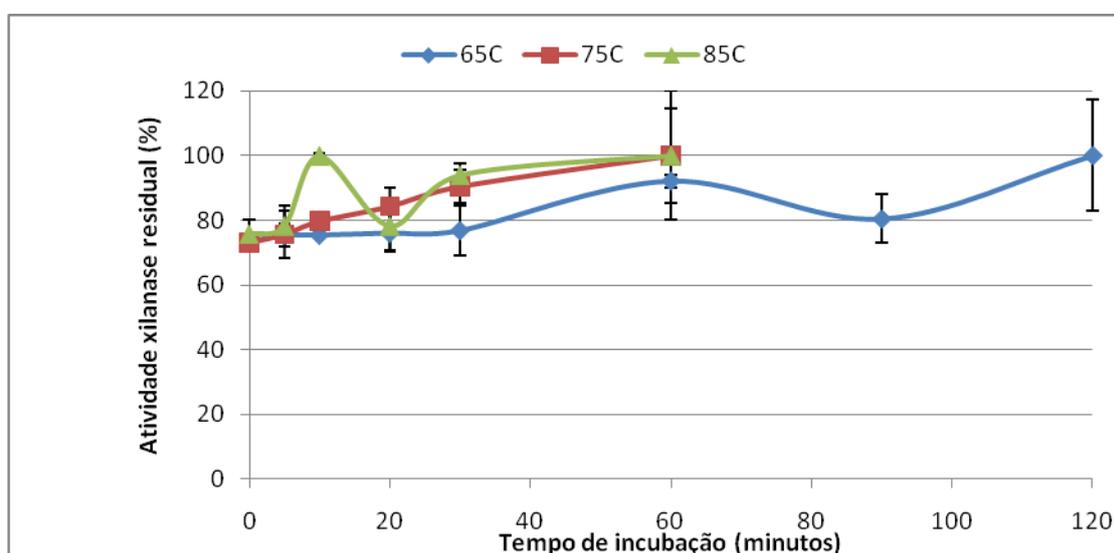
#### 4.7.2. Estabilidade Térmica e em diferentes pHs da xilanase parcialmente purificada excretada por *P. sanguineus*

A termoestabilidade da enzima xilanólítica parcialmente purificada de *P. sanguineus* foi estudada incubando-se a referida enzima na ausência de substrato, nas temperaturas de 65, 75 e 85°C, em diferentes períodos de tempo. Após a incubação, foi avaliada a atividade xilanólítica residual, nas condições ótimas de pH e temperatura 8,0 e 75 °C, respectivamente.

A curva da atividade residual contra temperatura esta apresentada na Figura 15. Pode-se verificar que a xilanase apresentou-se estável nas três temperaturas testadas. A 65 °C e após 2 h de incubação restou ainda 100 % da atividade inicial. Comportamento similar foi observado também a 75 °C, manteve-se estável em até 60 minutos de incubação. A 85°C, a atividade xilanólítica mostrou-se crescente até os 10 min iniciais de incubação,

posteriormente tendo uma pequena queda na atividade e mantendo-se termoestável até 60 minutos de incubação na referida temperatura. A estabilidade térmica em temperaturas mais elevada representa um ponto favorável para várias aplicações biotecnológica (SHAH & MADAMWAR, 2005; SANDRIM et al., 2005).

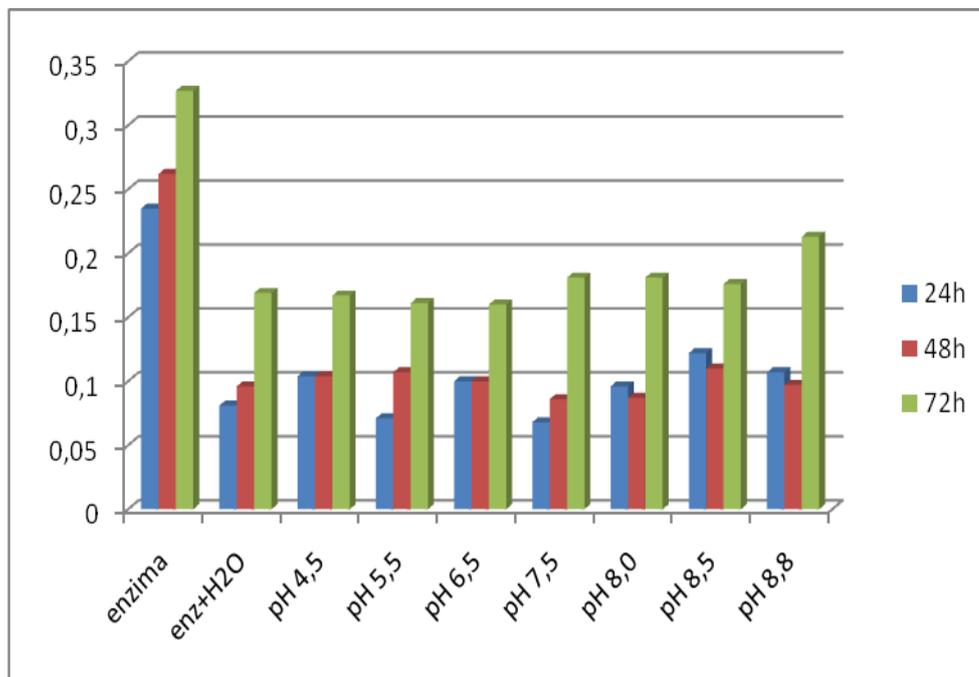
Estes resultados corroboram com dados obtidos por Damaso, 2003, onde o mesmo ensaiou outras espécies de fungos, nas quais se destacaram o *Thermoascus aurantiacus*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Paecilomyces variotim*, *Paecilomyces thermophila*, *Scytalidium thermophilum*, *Melanocarpus albomyces* e *Chaetomium thermiphile* com xilanases atuando entre 50 e 80 °C



**Figura 15:** Estabilidade térmica a 65°C, 75°C e 85°C da xilanase parcialmente purificada excretada por *P. sanguineus*.

O perfil de estabilidade em diferentes pHs da enzima xilanase parcialmente purificada de *P. sanguineus* está representado na Figura 16. Uma mistura de 1:1 (enzima:tampão) foi incubado por 24, 48 e 72 h, sem substrato e posteriormente dosadas as referidas atividades xilanólíticas. Em 24h de incubação é possível observar uma baixa estabilidade nos pHs 5,5 e 7,5 e maior estabilidade na faixa de 8,0 a 8,8, sendo verificado o maior pico em 8,5 (Figura16 ). Nas mesmas condições foram realizados ensaios com 48 e 72h de incubação e, os resultados confirmam a maior estabilidade na faixa de pH 8,0

a 8,8, com pico de 8,5 e 8,8 em 48 e 72h, respectivamente, sendo que os ensaios realizados em 72h apresentaram os melhores resultados entre os três testados (Figura 16).



**Figura 16:** Estabilidade em diferentes valores de pHs da enzima xilanase parcialmente purificada excretada por *P. sanguineus*, em 24h, 48h e 72h de incubação a 28°C.

A xilanase excretada por *P. sanguineus* purificada parcialmente e caracterizada, conforme descrito anteriormente apresentou características semelhantes às utilizadas na indústria de biobranqueamento de polpa de celulose, onde seu tratamento requer enzimas termoestáveis com estabilidade em pHs alcalinos, visto que o processo ocorre em altas temperaturas (acima de 70 °C) e em pH alcalino. Além disso, é necessário que o preparado enzimático seja livre de celulasas, para evitar o ataque às fibras de celulose, tenha xilanases muito ativas, para reduzir o custo, e com baixo peso molecular, para facilitar sua difusão na polpa (TCHAPUN, 2003). Dados estes presentes no complexo enzimático obtido neste trabalho, visto que os resultados da Tabela 7 demonstram a ausência de atividade celulolítica.

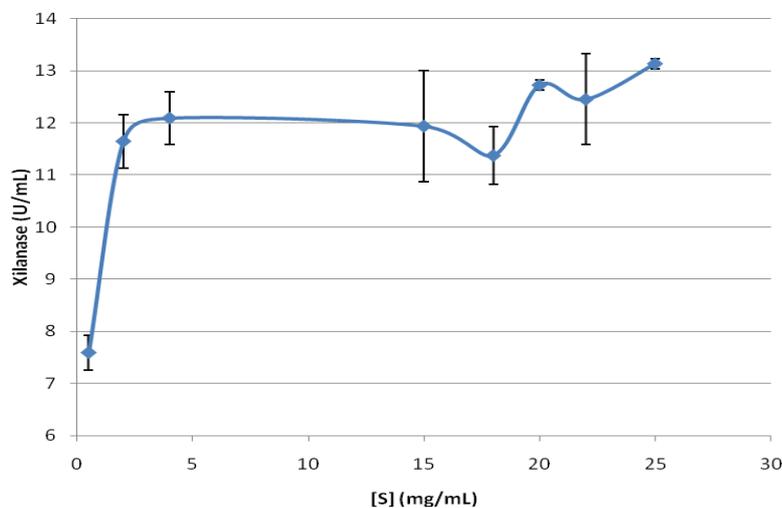
Nesta aplicação, as xilanases podem auxiliar, consideravelmente, na redução da poluição ambiental, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que resulta na formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente. Em função dos efeitos biológicos diretos em ecossistemas aquáticos de efluentes de branqueamento à base de cloro, existem, hoje, especialmente na América do Norte e Europa Ocidental, sérias restrições ao uso dos compostos clorados nos processos de branqueamento (SILVA, 2006; LO *et al*, 2009).

#### 4.7.3. Parâmetros cinéticos aparentes da xilanase parcialmente purificada de *P. sanguineus*

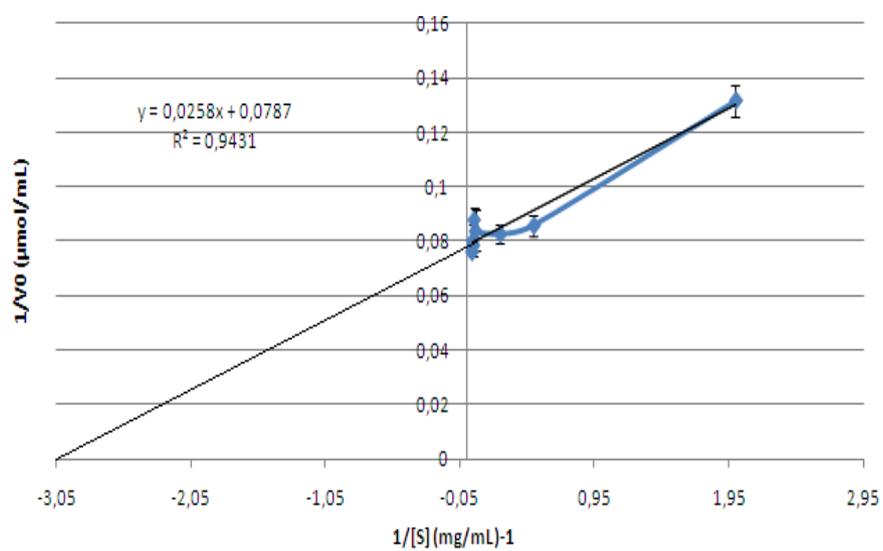
Para a xilanase parcialmente purificada, o gráfico de hidrólise do xilano versus concentração do substrato resultou numa hipérbole, o que confirmou o comportamento michaeliano da enzima, observado na Figura 17 A. Esses parâmetros foram determinados, conforme procedimento gráfico proposto por Lineweaver e Burk (1934), os valores foram detectados em xilano de birchwood a 1%.

Os valores aparentes encontrados para  $K_m$  de 0,32786 mg/mL e a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de 12,70648  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  (Figura 17 B).

A)



B)



**Figura 17 – (A)** Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade máxima inicial de uma reação catalisada por xilanase. **(B)** Gráfico do duplo-recíproco para determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{\max}$  da xilanase purificada de *P. sanguineus*. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 8,0, a 75 °C.

## 5 CONCLUSÃO

As condições ótimas de crescimento avaliadas no presente trabalho para *P. sanguineus*, isolado da região rural do Município de Parintins/ AM, foram de pH 5,0 e 35°C.

O estudo da produção de xilanase por *P. sanguineus* foi importante por oferecer subsídios para etapas posteriores de purificação e caracterização desta enzima.

A maior produção de xilanase foi obtida nos cultivos em meio líquido de Malte, contendo 2% de glicose, em pH 6,5, a 35 °C e 120 rpm, por 8 dias.

As condições ótimas de determinação da atividade xilanase parcialmente purificada de *P.sanguineus* foram pH 8,0 e temperatura de 75 °C. Esta enzima parcialmente purificada apresentou-se bastante estável na faixa de pH de 4,5 a 8,8 e de 65 a 85°C.

A massa molecular da xilanase excretada por *P. sanguineus* e determinada por PAGE-SDS correspondeu 39,44 kDa.

A enzima parcialmente purificada apresentou comportamento michaeliano típico, obtendo  $K_m$  da enzima de 0,32786 mg/ml, e o valor de  $V_{max}$  de 12,70648  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ .

O presente trabalho mostrou que a xilanase excretada pelo fungo *P. sanguineus* apresenta características semelhantes às utilizadas na indústria de biobranqueamento de polpa de celulose dos quais requerem atividade em pH alcalino e estabilidade em uma ampla faixa de pH e alta temperatura.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E. [Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from \*trametes hirsuta\*](#). American Society for Microbiology. p.3357-3362, Ago,2000.

ALBORÉS, S.; PIANZZOLA, M.J.; SOUBES, M. and CERDEIRAS, M.P. **Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus spp* for its use as ruminant feed**. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 9, no. 3, p. 215-220, June 2006

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

ARCHER, David B.; MACKENZIE, D.A & JEENES, D.J.. **Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi**. IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 96-126.2001.

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

HECK, J.X. **Produção, purificação e caracterização de xilanases (EC 3.2.1.8) excretadas por isolados amazônicos de *Bacillus* em cultivo semi-sólido**. Tese de Doutorado. Lume Repositório Digital. <http://hdl.handle.net/10183/12724> acesso em 12/05/2010.

AUST, S.D. **Degradation of Environmental Pollutants by *Phanerochaete***. 1990.

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

- BARR, D. P. **Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants Environmental Groups of Fungi.** Microbiology Ecology. 21: 73-84. 1994.
- BETTUCI, L. & GUERREO, R. T. **Hongos Xilófagos: Estúdio de Cultivos.** Bol. Univ. De la Rep. Montivideo, n. 188, p. 3-40, 1971.
- BHATIA, Y.; MISHARA, S.; BISARIA, V.S. **Microbiol  $\beta$ - glicosidase: cloning, properties and applications.** Critical Reviews in Biotechnology, Philadhefia, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BIELY, P. **Microbial xylanolytic system.** Trends in Biotechnology 3: 286-290, 1985.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry v.72, p. 248-54, 1976.
- BRICE, R.E., MORRISON, I.M. **Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fiber in an artificial rumen.** Appl Biochem Biotechnol. 30(1): 9-15, 1991.
- BUCHANAN, N.P. **The effects of nonstarch polysaccharide enzyme addition and dietary energy restriction on performance and carcass quality of organic broiler chickens.** Journal of Applied Poultry Research, Athnes, v. 16,p. 1-12, 2007.
- CARMONA, E.C., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., ROSIM MONTEIRO, R.T., JORGE,J.A. **Xylanase production by *Aspergillus versicolor*.** J. Basic Microbiol., Berlin, v.6,p.387-394, 1997.
- CARMONA, E.C., FIALHO, M.B., BUCHGNANI, E.B., COELHO, G.D., BROCHETO-BRAGA, M.R., JORGE, J.A. **Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*.** Process Biochem., London, v.40, p.359-364, 2005.
- CASTRO e SILVA, A. e AGUIAR, I. J. A. **Micromorfologia da Degradação da Madeira da Espécie Amazônica *Hura crepitans* L. Por Fungos Lignolíticos Pertencentes à Classe Hymenomyces .** Acta Amazônia, V 31, nº 3, p397 – 418, 2001.
- CASTRO E SILVA, A.;SOARES, E.P.; SILVA, A V.; NUNES, A S.; ARAUJO, S.P; DIAS R.A; TAVARES, B.P; SOUZA,E.A; MELO,J.L; **Determinação enzimática de fungos amazônicos em meio acrescido com farinha de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer).** Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 02 a 06 de outubro de 2011. Foz do Iguaçú.
- CLAS, H. **Laccases: structure, reactions,distribution.** Micron, 35: 93-96,2004.

CLEMONT,S.; CHARPENTIER, M.; PERCHERON,F. **Polysaccharidases from *Sporocytophaga myxococcoides*:  $\beta$ -mannanase, cellulase and xylanase.** Bull. Soc. Chim. Biol. 52: 1481-1495. 1970.

COELHO, G.D., CARMONA, E.C. **Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization.** J. Basic. Microbiol., Berlin, v.6, p.387-394, 2003.

COUTO, S.R.; MOLDES, D.; LIÉBNAS, A. & SANROMAN, A. **Investigation of several bioreactor onfigurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions.** Biochemical Engineering Journal, 15:21-26,2004.

CORTEZ, E. V., PESSOA-Jr. A. **Xylanase and  $\beta$ -xilosidase separation by fractional precipitation.** *Process Biochem.*, London, v. 35, p. 277-283, 1999.

D'ALMEIDA M.L.O. em "**Composição Química dos Materiais**" em **Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica.** Vol.I. Ed. IPT – São Paulo, SP, 1982.

DAMASO, M. C. T.; Andrade, F. M. C.; Pereira, N.; *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, p. 333. 2003.

DURAN, N.; FERRAZ, A.; MANSILA, H. **Biopulping: A new view on wood delignification.** Arch Biol. Technol. 33: 295-315. 1991.

ESPOSITO et al. **N phenoloxidasas and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain) applications.** Journal of Biotechnology, n.29, p.219-228, 1993.

ESPOSITO, Elisa & AZEVEDO, João Lúcio. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Educs, 2004.

FELIX, R.F.; NORONHA, E.F.; De MARCO, J.L. Proteases: características e aplicações industriais. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis summa, p. 327-347. 2004.

FERNANDES SALOMÃO,T. M., AMORIM, A. C. R., CHAVESALVES, V. M., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O., ARAÚJO, E. **L.Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*.** Revista de Microbiologia, v. 27, p. 1518,1996.

FERRAZ, A., CÓRDOVA, A. M., MACHUCA, A. **Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*.** Enzyme and Microbial Technology, 32: 59 . 65, 2003.

FERREIRA, F. S. **Crescimento Micelial e Produção Enzimática dos Fungos Deterioradores de Madeira.** Dissertação de Mestrado. UEA. Manaus, 2005.

GATTI, M.J. in **Micologia** Curso pós graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.RJ. 1997.

GIACOMETTI, R.A. **Valores energéticos e digestibilidade de nutrientes de farelo de arroz integral suplementado com complexos enzimáticos para frangos de corte.** Dissertação (mestrado em zootecnia). Universidade Federal de Lavras, 54 p. Lavras, 2002.

GODFREY, T. & WEST, S. (eds.). **Industrial enzymology**, 2<sup>nd</sup> Edition. Macmillan Press, London. 1996.

HALTRICK, D. et al. **Production of fungal xylanases.** Bioresour Technol., Essex v.58, p.137-161, 1996.

HASMANN, F. A., PESSOA-Jr., A., ROBERTO, I. C. **Screening of variables in  $\beta$ -Xilosidase recovery using cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Clifton, v. 91-93, p. 719-728, 2001.

HERRERA, A E. M. ***Thermoascus aurantiacus* (CEPA BRASILEIRA: Aspecto do Crescimento, Produção Enzimática e Utilização no Tratamento de Materiais Lignocelulósicos.** Dissertação de Mestrado. Campinas: Universidade de Campinas. 1991.

KHANDEPARKAR, R.D.S., BHOSLE, N.B. **Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp.** MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enz. Microb. Technol.* 39(4): 732-742, 2006.

KHENG, P. P., OMAR, I. C. **Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate.** *Songklanakarin Journal of Science and Technology*: 27(2): 325-336, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A. & RAO, M. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** *FEMS Microbiology Letters*. **23**: 411-456. 1999.

LACAZ, C.S. **Micologia Médica**, 9 ed. São Paulo: SAVIER, 109p. 2002.

LAGUNA, J. **Bioquímica**, 2<sup>a</sup> ed., Facultad de Medicina, UNAM, Mexico D.F., Fournier S.A., 1969.

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

LASA, I.; BERENGER, J.; *Microbiology*, Vol 9, 77. 1993

LEHNINGER, Albert Lester et al. **Princípios de bioquímica.** 5 edição. São Paulo: SARVIER, 2011.

LINEWEAVER, H. AND BURK, D. **The determination of enzyme dissociation constants.** J. Am. Chem. Soc. 56: 658-666, 1934.

LINKO, M.; POTANEN, K.; VIHKARI, L. **New developments in the application of enzymes for biomass processing.** In: M.P. Coughlan (ed.), *Enzyme Systems for Lignocellulose degradation*. Londres: Elsevier Applied Science, pp 331-346. 1989.

LOWE, D. A . **Production of enzymes.** IN.: Basic Biotechnology, Edited by Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 392-408. 2001.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação de Doutorado.146f.

MADIGAN, M. T.; OREN, A.; **Thermophilic and halophilic extremophiles** *Current. Opion in Microbiol.*, Vol 2, 265 - 269.1999.

MANCILHA, E. **Seleção de basidiomycetes coletados e isolados em área de mata atlântica - PE, com atividade fenoloxidase e sua aplicação na descoloração de corantes sintéticos.** 2006. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MEDEIROS, L. Á. **Xilanase de *penicillium crysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no branqueamento de poupa celulósica de pseudo caule de bananeira frutífera.** 126f. Tese de Doutorado em Ecologia Aplicada. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2007.

MILAGRES, A. M. F., BORGES, L., AGUIAR, C. L. **Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos.** Anais do SHEB, n. 4, p. 261-269,1994.

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

MUNIZ,V.A;GALUCIO, V.A; ANDRADE, F.S; SOUZA, L.C.C.; BITENCOURT,A; NUNES, A.S.; MOURA,S.S. PROCOPIO, A.R.L.; CASTRO E SILVA, A. **Isolamento de bactérias a partir da degradação de polímero em lixão a céu aberto do município de Parintins.** Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 02 a 06 de outubro de 2011. Foz do Iguaçu.

NAGASHIRO C. Enzimas na nutrição de aves. In: Conferencia Apinco de Ciência e Tecnologia avícola. Anais...Santos: APINCO, p:307-327, 2007.

NOBLES, M.K. & FREW B. P. **Studies Hymenomycetes. The genus *Pycnoporus*.** Can. J. Bot. 1965.

OUHIDA, I.; PEREZ, J.F.; GASA, J. **Enzymes ( $\beta$ -glucanase and arabinoxylanase and/or sepiolite supplementation improve the nutritive value of barley-wheat based diets for broiler chickens.** British Poultry Science. Cambridge, v. 41, n. 5, p. 617-624, 2000.

PALACKAL, N.; Brennan, Y.; Callen, W. N.; Dupree, P.; Frey, G.; Goubet, F.; Steer, B. A.; ***Protein Sci.*** 13, 494. 2004

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G. 2000. **Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*** *Appl and Environmental Microbiology*. 1:920-924.2000.

PAN, I-H, YAO, H. J., LI, Y. K. **Effective extraction and purification of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase portioning.** *Enz. Microb. Technol.*, Surrey, v.28, p.196-201, 2001.

PANDEY, A. ; NIGAM, P; SOCCOI, C.R; SOCCOI, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. **Advances in microbial amylases.** *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 131-152. 2000.

PÉREZ-SILVA, E. **Aspectos sobre el uso y la distribución de *Pycnoporus sanguineus* (Polyporaceae) en México.** Revista Mexicana de Microbiología, v. 04, p. 137-144, 1988.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. **Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture.** *Mycologia*, v. 212, p. 834-339, 2000.

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*. 67: 577-591. 2005.

PUTZKE, Jair. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. v.1 e v.2.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. **The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*.** *Process Biochemistry*, 39:561- 1566. 2004.

QUIROGA, E.; VATTUONE, M.A. & SAMPIETRO, A.R. **Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1251 (2): 75-80, 1995.

QUIROZ-CANTAÑEDA, R. **Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw médium.** *Microbial biotechnology*. Vol. 12 No. 4, Issue of October 15, 2009.

- RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001.
- RODRIGUES, M. P. et al. **Desempenho de frangos de corte nas fases de crescimento e terminação com rações à base de milho**. 2004. Disponível [HTTP://www.sbz.org.br/PortoAlegre/homepages/bz/Nut/NUT027.htm](http://www.sbz.org.br/PortoAlegre/homepages/bz/Nut/NUT027.htm). Acesso em 19/01/2010
- SANDRIM, V.C., RIZATTI, A.C.S., TERENCE, H.F., JORGE, J.A., MILAGRES, A.M.F., POLIZELI, M.L.T.M. **Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching**. *Process Biochem.*, London, v. 40, p.1823-1828, 2005.
- SHAH, A., MADAMWAR, D. **Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization**. *Process Biochem.*, London, v.40, p.1763-1771, 2005.
- SILVA, M. L. C. et al. **Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas**. *Química Nova*, v.29, n.1, p.85-92, 2006.
- SILVA, L.A.O. **Produção, Purificação e Caracterização de Xilanases excretadas por *T. inhamatum***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, UNESP, 2006.
- SING, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26(7), p. 502- 508, 2000.
- SHISHIDO, K. **The application of molecular genetics to oriental mushrooms. Applied molecular genetics of filamentous fungi**, 9:201-213. 1992.
- SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A.; LEITE, C.L. **Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products**. *Revista de Microbiologia*, v. 29, n 04. São Paulo, Out/Dez, 1998.
- STETTER, K. O.; *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 149. 1996.
- SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. **Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Applications**. *Crit. Rev. Biotechnol.*, Boca Raton, v.22, p.33-64, 2002.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. **Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi**. *Mycologia*, 81:234-240. 1989.
- UHLIG, H. **Industrial Enzymes and Their Applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc. p454. 1998.

TAN, L. U. L. et al **Purificación and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus***. Canadian Journal Microbiology 33:689-694.1987.

TEIXEIRA, D.E.; da COSTA, A.F. & SANTANA, M.A. **Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores**. Scientia Forestalis, 52: 29-34, dez, 1997.

TCHAPUN, C.; POOSARAM, N.; WATANABE, M.; **Process Biochem.**, 38, 1327. 2003

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. **Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus***. Research in Microbiology, 157(2):119-124. 2006.

VAN DER BROECK, H. C., DE GRAAFF, L. L., HILLE, J. D. R., VAN OOYEN, A.J. J. AND HARDER, A. **Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper products**. Eur. Pat. Appl. 90:202-220, 1990.

VASCONCELOS, A.F.D.A.;BARBOSA, A.M.;DEKKER,R.F.H.;SCARMINIO I.S.**Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp.In presence of veratryl alcohol by the response-surfase method**. Process Biochemistry, 35: 1131-1138, 2000.

VLAEV, S. D., DJEJEVA, G., RAYKOVSKA, V., SCHÜGERL, L. **Cellulase production by *Trichoderma* sp grown on corn fibre substrate**. Process Biochemistry, v. 32, n. 7, p. 561565,1997.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando a produção de substâncias antibacteriana**: 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WILCOX, W.W. **Changes in wood microstructure through pregressive stages of decay**. USDA Forest Service. Research Paper FPL 70. 1968. 72p.

WOODWARD, J. **Xylanases: Functions, Properties and Applications**. In: Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biiotechnology, Cap. 2:9 . 30, 1984.

WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. In: M.P. Coughlan & G.P. Hazlewood (eds.) **Hemicellulose & Hemicellulases**. Page 127-139. London: Portand Press. 1993.

XIONG H., von WEYUMARN, N., LEISOLA, M., TURUNEN, O. **Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30**. Process Biochem.,London, v. 39, p. 729-733, 2004

ZANELLA, I. **Efeito da suplementação de enzimas em dietas a base de milho e sojas processadas sobre a digestibilidade e desempenho de corte.** Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Jaboticabal, 1998.

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

ZULFADHLY, Z.; MASHITAH, M.D.; BHATIA, S. **Heavy metals removal in fixed-bed column by the macro fungus *Pycnoporus sanguineus*.** *Environmental Pollution*, v. 112, p. 463-470, 2001.