

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS TERMOESTÁVEIS DE *Humicola* sp 179-5
E APLICAÇÃO DESTAS ENZIMAS

44/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS TERMOESTÁVEIS DE *Hemicola* sp 179-5
E APLICAÇÃO DESTAS ENZIMAS

Parcer

Este exemplar corresponde a
redação final da tese defendi-
da por Roberto da Silva e apro-
vada pela Comissão Julgadora
em 18.12.92.

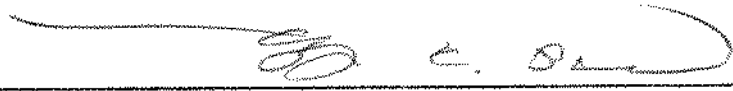
Roberto da Silva
(Orientado)

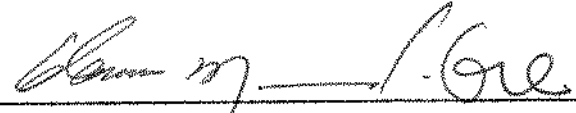
Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)

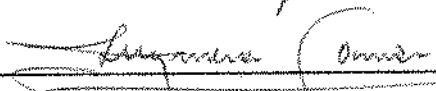
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciência de Alimentos

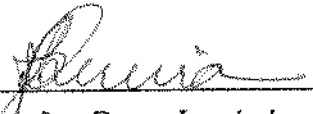
Campinas, 1992

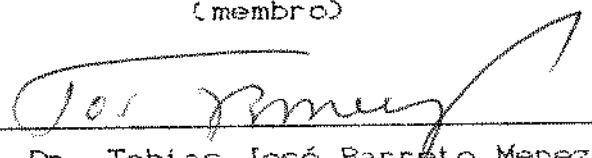
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Yong Kun Park
(orientador)


Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
(membro)


Profa. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva
(membro)


Prof. Dr. José Luiz Pereira
(membro)


Prof. Dr. Tobias José Barreto Menezes
(membro)

Prof. Dra. Iracema de Oliveira Moraes
(membro)

Prof. Dr. Francisco Maugerí Filho
(membro)

Campinas, 18 de dezembro de 1992

A minha mãe Guiomar

A minha esposa Célia

A nossa filha Manuela

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pelos ensinamentos e orientação dedicada.

Aos professores da área de bioquímica do Departamento de Química e Geociências da UNESP - São José do Rio Preto, que em 1991 assumiram meus encargos docentes, permitindo a realização de importante etapa deste curso.

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela oportunidade de realizar este curso.

As professoras Gláucia Pastore e Helia Sato, pelas colaborações e estímulos frequentes na condução deste trabalho.

Aos Srs. Sarkis e Guido, da Champion Papel e Celulose Ltda. de Mogi-Guaçu, SP, pelo fornecimento das polpas e análises após o tratamento enzimático.

Ao Sr. Marco Pupini, pesquisador do CPQBA/UNICAMP, pela colaboração na análise de HPLC.

Ao Sr. Dongo Yim, pela colaboração na análise de Eletroforese.

Ao Prof. José Luiz, do Laboratório de Microbiologia da FEA/UNICAMP pela liofilização das amostras.

Ao Prof. Sebastião, do Departamento de Biologia do IBILCE/UNESP pela colaboração nas fotomicrografias.

A Sra. Rita Beatriz, do Departamento de Química e Geociências e à Sra. Sandra R. Martins, da UPD da UNESP de S. J. do Rio Preto, pela digitação do texto.

Aos técnicos Eliana e Paulo, pelas contribuições prestadas.

As colegas Marina, Regina, Rose, Angelita e Gabriela, pelos bons momentos e pelas colaborações dadas.

A Dora, pela amizade, colaboração e cafezinhos.

A CAPES/PICD, pela bolsa de deslocamento.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação - ABIA, pelo fornecimento das cópias desta tese.

INDICE

Página

INDICE DE TABELAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Nomenclatura das enzimas.....	5
2.2. Materiais lignocelulósicos.....	6
2.3. Hemicelulases.....	12
2.4 Celulases.....	25
3. MATERIAIS E METODOS.....	39
3.1. Materiais.....	39
3.1.1. Equipamentos.....	39
3.1.2. Reagentes.....	39
3.1.3. Meios de cultura para produção das enzimas.....	40

3.1.3.1. Meio sólido (M-1).....	40
3.1.3.2. Meio líquido (M-2).....	40
3.1.3.3. Meio líquido (M-3).....	41
3.1.3.4. Meio líquido (M-4).....	42
3.1.3.5. Meio líquido (M-5).....	43
3.1.3.6. Leowians Agar.....	43
3.1.3.7. PDA (Batata Dextrose Agar).....	43
3.1.3.8. Czapeck"s Agar.....	43
3.1.3.9. Corn Meal Agar.....	44
3.1.3.10 Malt Extract Agar.....	44
3.1.4. Microrganismo.....	44
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Seleção e isolamento do microrganismo termófi- lo.....	45
3.2.1.1. Pré-seleção dos microrganismos.....	45
3.2.1.2. Seleção do microrganismo.....	45
3.2.2. Produção de enzima por fermentação em meio só- lido.....	46
3.2.3. Produção de enzima por fermentação submersa....	46
3.2.4. Determinação de açúcares redutores.....	47
3.2.5. Princípios da ação enzimática.....	47
3.2.6. Determinação das atividades enzimáticas.....	48
3.2.6.1. Atividade de xilanase (endoenzima)....	48
3.2.6.2. Atividade de CMCase.....	48
3.2.6.3. Atividade de avicelase.....	48
3.2.6.4. Atividade de β -xilosidase.....	49
3.2.6.5. Atividade de β -glicosidase.....	49

3.2.6.6. Atividade de α -glicosidase.....	49
3.2.6.7. Atividade de arabinofuranosidase.....	50
3.2.7. Unidade de atividade enzimática.....	50
3.2.8. Concentração da enzima bruta.....	50
3.2.9. Purificação do sistema xilanase.....	51
3.2.9.1. Produção da enzima.....	51
3.2.9.2. Precipitação com etanol.....	51
3.2.9.3. Cromatografia em DEAE-sephadex A-50..	52
3.2.9.4. Cromatografia em CM-sephadex C-50....	53
3.2.10. Análise do padrão de ação enzimática.....	53
3.2.10.1. Cromatografia em papel.....	54
3.2.10.2. HPLC.....	54
3.2.11. Determinação do peso molecular.....	54
3.2.11.1. Cromatografia em coluna de sepha- dex B-200.....	54
3.2.11.2. Eletroforese SDS-PAGE.....	55
3.2.11.2.1. Preparo das amostras de proteínas para eletrofo- rese.....	55
3.2.11.2.2. Proteínas padrão usadas na eletroforese.....	56
3.2.11.2.3. Preparo do gel e desen- volvimento da eletrofo- rese.....	56
3.2.12. Determinação quantitativa de proteínas.....	57
3.2.13. Caracterização físico-química das enzimas....	57

3.2.13.1. Efeito do pH na atividade enzimática.....	57
3.2.13.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	58
3.2.13.3. Efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática.....	58
3.2.13.4. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade enzimática.....	58
3.2.14. Determinação das curvas de hidrólise dos substratos celulósicos e hemicelulósicos.....	59
3.2.15. Determinação do efeito de íons metálicos e substâncias químicas sobre a atividade das xilanases.....	59
3.2.16. Tratamento enzimático da polpa de eucalipto..	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Isolamento do microrganismo.....	61
4.2. Identificação.....	61
4.3. Estudo da produção de enzimas pela linhagem do <u>Humicola</u> sp 179-5.....	62
4.3.1. Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de xilanase.....	62
4.3.2. Efeito do tipo de meio de cultura sobre as diversas atividades enzimáticas.....	65
4.3.3. Curva de crescimento e produção enzimática....	66
4.3.3.1. Meio sólido.....	67

4.3.3.2. Meio líquido.....	67
4.4. Caracterização físico-química das enzimas brutas.....	70
4.4.1. Efeito do pH na atividade das enzimas brutas..	70
4.4.2. Efeito da temperatura na atividade das enzimas brutas.....	72
4.4.3. Efeito do pH na estabilidade das enzimas bru- tas.....	74
4.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade das en- zimas brutas.....	75
4.5. Determinação das curvas de hidrólise dos subs- tratos pelas enzimas brutas.....	78
4.5.1. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de xi- lano pela enzima bruta.....	78
4.5.2. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de ara- binóxilano pela enzima bruta.....	79
4.5.3. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de CMC pela enzima bruta.....	79
4.5.4. Determinação das curvas de hidrólise de vários glicanos pela enzima bruta.....	83
4.6. Purificação do sistema xilanase.....	85
4.6.1. Produção da enzima.....	85
4.6.2. Precipitação com etanol.....	86
4.6.3. Cromatografia em DEAE-sephadex A-50.....	86
4.6.4. Cromatografia em CM-sephadex C-50.....	88
4.7. Caracterização físico-química das xilanases purifi- cadas.....	98

4.7.1. Efeito do pH na atividade das xilanases purificadas.....	98
4.7.2. Efeito da temperatura na atividade das xilanases purificadas.....	100
4.7.3. Efeito do pH na estabilidade das xilanases purificadas.....	100
4.7.4. Efeito da temperatura na estabilidade das xilanases purificadas.....	103
4.8. Determinação do peso molecular das xilanases purificadas.....	105
4.8.1. Filtração em gel de sephadex G-200.....	105
4.8.2. Eletroforese em SDS-PAGE.....	107
4.9. Determinação do efeito de ions metálicos e substâncias químicas sobre a atividade das xilanases purificadas.....	107
4.10. Efeito de sinergismo das xilanases purificadas sobre hidrólise do arabinoxilano.....	110
4.11. Tratamento enzimático da polpa de eucalipto obtida por processo Kraft.....	112
5. CONCLUSÕES.....	116
6. BIBLIOGRAFIA.....	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
1. Composição química dos materiais lignocelulósicos.....	8
2. Atividades enzimáticas dos cultivos em meios sólidos e líquidos.....	66
3. Resumo do processo de purificação do sistema de xilanases do <u>Humicola</u> sp 179-5.....	92
4. Atividade das xilanases purificadas contra vários substratos.....	96
5. Efeito de íons metálicos e inibidores nas atividades das xilanases purificadas.....	109
6. Polpa de eucalipto obtida por processo Kraft e tratada com enzimas.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema representativo da estrutura celular vegetal.....	7
2. Esquema representativo da molécula de xilano.....	10
3. Estrutura química representativa da molécula de lignina..	11
4. Representação esquemática da ação sinérgica de enzima envolvidas na degradação de celulose.....	30
5. Fotomicrografia da linhagem do <u>Humicola</u> sp 179-5.....	63
6. Efeito da temperatura de crescimento do <u>Humicola</u> sp 179-5 na produção de xilanase.....	64
7. Produção enzimática do <u>Humicola</u> sp 179-5 no processo fermentativo em meio sólido.....	68
8. Produção enzimática do <u>Humicola</u> sp 179-5 no processo fermentativo submerso	69
9. Efeito do pH sobre as atividades das enzimas brutas.....	71
10. Efeito da temperatura nas atividades das enzimas brutas..	73
11. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas brutas.....	76

12. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas brutas.....	77
13. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de xilano (Larchwood) pela enzima bruta.....	80
14. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de arabinoxilano (Oatt Spelt) pela enzima bruta.....	81
15. Efeito da temperatura sobre a hidrólise de CMC pela enzima bruta.....	82
16. Curvas de hidrólise de diferentes β -glicanos pelas enzimas brutas.....	84
17. Cromatografia em coluna de DEAE-sephadex A-50.....	87
18. Cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 da Fração X-I.....	89
19. Cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 da Fração X-II.....	90
20. Cromatografia em coluna de CM-sephadex C-50 da Fração X-III e da arabinofuranosidase.....	91
21. Cromatografia em papel dos hidrolisados de xilano pelas xilanases purificadas.....	94

22. Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) dos produtos de hidrólise de arabinoxilano pelas xilanases purificadas.....	97
23. Efeito do pH sobre as atividades das xilanases purificadas.....	99
24. Efeito da temperatura sobre as atividades das xilanases purificadas.....	101
25. Efeito do pH sobre a estabilidade das xilanases purificadas.....	102
26. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das xilanases purificadas.....	104
27. Determinação do peso molecular das xilanases purificadas por cromatografia em coluna de sephadex G-200.....	106
28. Determinação do peso molecular das xilanases purificadas por eletroforese SDS-PAGE.....	108
29. Efeito de sinergismo das xilanases purificadas sobre a hidrólise do arabinoxilano.....	111
30. Cromatografia em papel dos hidrolisados da polpa de eucalipto pelas xilanases.....	114

RESUMO

Uma linhagem de fungo termófilo xilanolítico Humicola sp foi isolada a partir de madeira em decomposição da floresta Amazônica. O fungo produziu quantidade significativa de xilanases termoestáveis quando cultivado a 50°C em meio de farelo de trigo. A produção de avicelase foi desprezível e o extrato enzimático bruto hidrolisou xilano a 60% como xilose. Além de atividade de xilanase o extrato enzimático bruto apresentou atividade de CMCase e de β -glicosidase que foram caracterizadas físico-quimicamente. A xilanase, termoestável a 60°C por 1 hora, foi purificada através de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e CM-Sephadex C-50 e revelou três frações de proteínas com atividades xilanásicas. A fração X-I não se ligou à coluna de DEAE-Sephadex A-50 e foi eluída no volume correspondente ao volume morto da coluna. Os pHs ótimos e temperaturas ótimas das xilanases purificadas foram: 5,0-5,6 e 75°C (X-I); 4,2 e 65°C (X-II); 5,0-5,6 e 75°C (X-III). $HgCl_2$ inibiu completamente as três xilanases, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ inibiu-as fortemente e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e EDTA acarretaram inibições significativas. $CaCl_2$ estimulou a atividade das três xilanases enquanto iodoacetamida não afetou a atividade destas enzimas. Os pesos moleculares das xilanases X-I e X-II foram 30.000 Da e 43.000 Da, respectivamente. As xilanases X-I e X-III são endoxilanases e hidrolisaram xilano produzindo xilose, xilobiase, xilotriose e outros xilooligossacarídeos. A xilanase X-II é exoxilanase cujo produto da ação sobre xilano foi unicamente xilose. A fração X-I não apresentou nenhuma outra atividade en-

zimática, enquanto as frações X-II e X-III mostraram atividades de CMCase e de arabinofuranosidase. A polpa de eucalipto branqueada, obtida por processo Kraft, quando tratada com a xilanase X-I resultou em melhora da qualidade do papel (alvura e viscosidade). Entretanto, o tratamento com as xilanases X-II e X-III aumentou a alvura mas reduziu a viscosidade devido a degradação da celulose. O tratamento com a enzima bruta também melhorou a qualidade da polpa porque o extrato enzimático bruto possui baixa atividade CMCase.

SUMMARY

Thermophilic mold strain, Humicola sp. 179-5, which was isolated from decayed wood in the tropical Amazon forest, produced thermostable extracellular xylanases at 60°C. The xylanases were purified by DEAE-Sephadex and CM-Sephadex C-50 gel column chromatographies and three fractions of protein with xylanase activity were found. The optima pH and temperature of the purified xylanases activities were 5.0-5.6 and 75°C (X-I); 4.2 and 65°C (X-II) and 5.0-5.6 and 75°C (X-III). HgCl₂ completely inhibited the three xylanases, CuSO₄.5H₂O strongly inhibited all three xylanases and MgSO₄.7H₂O, CoCl₂.6H₂O, FeCl₃.6H₂O and EDTA showed considerable inhibition. CaCl₂ stimulated the activity of the three xylanases. Molecular weights of xylanase X-I and X-II were 30,000 and 43,000. Xylanase X-I is an endoxylanase and no other enzyme activity was found. Xylanase X-II is a xylosidase, besides showing CMCase and arabinosidase activities. The xylanase X-III is also endoxylanase and the enzyme showed arabinosidase and CMCase activities higher than xylanase X-II. Treatment of the purified enzymes including crude enzyme to the bleached Kraft eucalyptus pulp demonstrated that xylanase X-I improved the pulp for paper production, whereas xylanases X-II and X-III increased the brightness of pulp but decreased viscosity due to degradation of cellulose. Crude enzymes also improved the pulp quality because the enzyme contained low CMCase activity.

I . INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos são compostos de três componentes principais: celulose (30 - 75%), hemicelulose (10 - 40%) e lignina (15 - 30%). Eles constituem a maior fonte de biomassa renovável do mundo. O potencial de sua utilização para conversão a produtos úteis como o etanol gerou um interesse muito grande em desenvolver processos para a viabilização destas transformações. Este interesse pode ser avaliado pelos milhares de artigos científicos publicados no mundo todo.

Apesar dos inúmeros esforços despendidos, ainda não se viabilizou nenhuma operação desta natureza em escala industrial. Estas operações não obtiveram sucesso devido à natureza recalcitrante inerente à lignina, que nas plantas esta estreitamente associada à celulose e hemicelulose tornando-as inacessíveis ao ataque de microrganismos e enzimas. Este problema tem sido contornado, em parte, pelo emprego de uma operação inicial de pré-tratamento visando destruir a estrutura da parede celular da planta liberando a celulose e hemicelulose para o ataque enzimático.

A degradação da celulose até seus monômeros constituintes já foi bastante estudada e hoje seu mecanismo esta esclarecido. Ela é hidrolisada pela ação sinérgica da exoglucanase (celobiohidrolase), endoglucanase e β -glicosidase. O sistema enzimático das celulasas de muitos microrganismos já foi estudado, e variam em atividade e proporção entre os microrganismos. O microrganismo mais proeminente desta categoria e que produz altos níveis

de celulases e xilanases ativas, embora tenha baixo nível de β -glicosidase é o fungo celulolítico mesofílico Trichoderma reesei e suas linhagens mutantes.

A degradação da hemicelulose, devido à sua natureza altamente heterogênea, é ainda pouco compreendida. Entretanto, a degradação do xilano, seu principal polissacarídeo, tem sido bem esclarecida. Como a molécula de xilano possui cadeias laterais de resíduos de arabinose, glicose, ácido-4-O-metilglicurônico e D-acetila, a sua hidrólise total exige um maior número de enzimas. Assim, a sacarificação do xilano inclui as enzimas desramificantes α -L-arabinosidase, α -D-glicosidase, α -glicuronidase e xilano acetil esterase, além, é claro, das xilanases que quebram o esqueleto de xiloses. As xilanases incluem endoxilanases, β -xilosidasas e exoxilanases (cuja ação é limitada pelos pontos de ramificações e estas limitações dependem se o ataque delas sobre o xilano foi precedido pela ação das enzimas desramificantes).

A transformação do xilano em produtos úteis para fermentação ou produção de insumos para a indústria farmacéutica e alimentícia (xilose, xilitol) pode ser realizada por processos químicos ou pelo uso de xilanases.

Além disso a xilanase pode ser útil na extração de sucos de frutas e clarificação de vinhos.

Na década de 80, houve um crescente interesse na aplicação das xilanases em processos de polpa para papel. Particularmente elas facilitam o processo de branqueamento da polpa obtida por

processo Kraft e melhoram as propriedades das fibras. Isto acontece porque durante os estágios iniciais de polpação por processo Kraft ou alcalino, xilanos são largamente dissolvidos, mas podem ser reprecipitados sobre a superfície da fibra, sendo que 10 - 30% (peso/peso) permanece na polpa obtida por estes processos. Se é desejável remover xilano da polpa pode-se conseguir isto com xilanases.

Preparações de xilanases microbianas para serem usadas em polpa para papel devem ser livres de celulases, que de outra forma podem degradar a celulose e diminuir viscosidade e rendimento.

As xilanases de microrganismos mesofílicos são instáveis ao aquecimento, resultando em baixa eficiência de hidrólise. O uso de xilanases termoestáveis para realizarem a hidrólise de xilano a altas temperaturas por períodos prolongados de tempo poderiam aumentar a viabilidade técnica e econômica do processo de hidrólise.

Embora vários grupos de microrganismos lignocelulolíticos conhecidos apresentem seus sistemas enzimáticos bem caracterizados e até utilizados em escala industrial, a cada dia as pesquisas mundiais demonstram que as atividades de novos isolados têm sido comparáveis ou superiores às linhagens tradicionais. A natureza representa uma fonte interminável de microrganismos xilanolíticos e especialmente países tropicais como o Brasil, que apresenta uma flora microbiana tão diversificada, certamente abriga espécies de microrganismos desconhecidos de relevante interesse industrial. Desse modo este trabalho foi desenvolvido para alcançar os

seguintes objetivos:

- a) Selecionar uma linhagem de microrganismo termófilo com sistema de xilanases de alta atividade, termocestável e com baixa atividade de exoglucanase (celobiohidrolase);
- b) Caracterizar a preparação enzimática bruta deste microrganismo quanto ao sistema celulolítico e xilanolítico;
- c) Purificar o sistema xilanolítico para caracterização;
- d) Estudar a aplicação das xilanases em polpa de eucalipto visando melhorar as propriedades do papel.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NOMENCLATURA DAS ENZIMAS

Endoxilanase⁽¹⁾ ou 1,4- β -D-xylan xylanohidrolase (EC 3.2.1.8; endo-1,4- β -xylanase).

β -Xilosidase⁽¹⁾ ou β -D-xyloside xylohidrolase (EC 3.2.1.37, xylan 1,4- β -xylosidase).

Avicelase⁽²⁾ ou Exo-1,4- β -D-glucanase ou Exocelobiohidrolase (EC 3.2.1.91, 1,4- β -D-glucan-cellobiohidrolase).

CMCase⁽²⁾ ou Endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4, 1,4- β -D-glucan glucanohidrolase).

β -Glicosidase⁽²⁾ ou Celobiase (EC 3.2.1.21, β -D-glucoside, glucohidrolase).

Arabinofuranosidase⁽³⁾ ou arabinosidase ou α -L-arabinofuranoside arabinofuranohidrolase, EC 3.2.1.55).

(1) JURASEK & PAICE (1988b)

(2) WOOD & BHAT (1988)

(3) KAJI, A. et alii (1981)

2.2. MATERIAIS LIGNOCELULOSICOS

A matéria lignocelulósica consiste de três componentes principais, que são celulose, hemicelulose e lignina. As proporções destes componentes são bastante variáveis dependendo da fonte de obtenção: resíduos agrícolas ou árvores. No caso de resíduos é mais difícil estabelecer as proporções desses componentes em função das diversidades envolvidas (tipo de matéria prima, processamento, estado de decomposição, etc.). Se considerarmos apenas árvores estas proporções podem ser estimadas dependendo do grau de dureza da madeira (KOSARIC et alii 1988).

A proporção média em peso, dos três componentes principais dos lignocelulósicos é de 4:3:3 para celulose, hemicelulose e lignina respectivamente. A célula da madeira pode ser representada como uma estrutura de multicamadas como ilustra a figura 1. A lamela média (M) envolve a célula e é fortemente lignificada fornecendo a rigidez estrutural (1-2 μ m espessura). A próxima camada é a parede principal (P) que é relativamente fina (300Å). Ela corresponde a três camadas de fibrilas elementares de celulose as quais estão orientadas transversalmente ao longo do eixo da célula. As próximas três camadas, a lamela de transição (S₁), parede secundária (S₂) e parede secundária interna (S₃) contêm a maior parte da celulose e medem 1-10 μ m de espessura. O lúmen contém o material intracelular (KOSARIC, 1988).

As composições dos vários materiais lignocelulósicos são apresentados na tabela 1. As madeiras apresentam altos teores de celulose (30 - 75%) enquanto resíduos agrícolas são menores em ce-

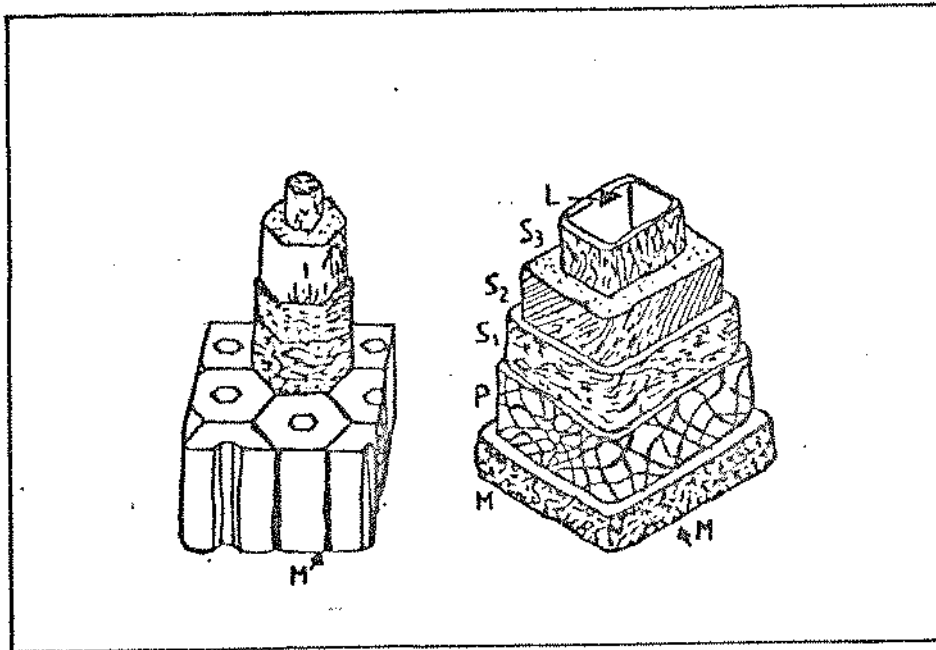


Figura 1: Estrutura representativa de uma célula vegetal.

M, Lamela média; P, Parede principal; S₁, Lamela de transição; S₂, Parede celular secundária; S₃ Parede secundária interna e L, lúmen (material intracelular) (KOSARIC et alii, 1988).

lulose (30 - 45%). Por outro lado, a porcentagem de hemiceluloses varia (10 - 45%) dependendo do tipo de material. O teor de lignina, em geral, é maior em madeira do que em resíduos agrícolas. Desta forma, as madeiras são mais difíceis de serem utilizadas para processos de bioconversão (CHAHAL, D.S. 1985).

	Composição Média (% peso seco)	
Madeira Dura (Angiosperma) ⁽¹⁾ (eucalipto, carvalho)	Celulose	45 - 75
	Hemicelulose	10 - 35
	Lignina	15 - 20
Madeira Macia (Gimnosperma) ⁽¹⁾ (pinho, cedro)	Celulose	30 - 51
	Hemicelulose	25 - 40
	Lignina	24 - 30
Resíduos Agrícolas ⁽²⁾ (bagaço de cana, milho, sorgo, etc.)	Celulose	30 - 45
	Hemicelulose	16 - 27
	Lignina	3 - 13

Tabela 1: Composição química de vários materiais lignocelulósicos.

1. KOSARIC et alii (1988)
2. CHAHAL (1985)

A celulose é um homopolímero linear de unidades de anidroglicose unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas. O comprimento da macromolécula varia muito com a fonte e o grau de tratamento que ela sofreu. Por exemplo, celulose de papel tem um grau de polimerização (DP) médio de 1.000 enquanto celulose de algodão (a forma mais pura da celulose disponível na natureza) tem um DP de cerca de 10.000 (CALLIHAN & CLEMMER, 1979).

A estrutura primária não é o fator principal que torna a molécula de celulose nativa tão resistente à hidrólise. É o efeito da configuração secundária e terciária da cadeia de celulose, bem como sua associação estreita com outras estruturas poliméricas protetoras dentro da parede celular da planta, tais como lignina (principalmente), amido, pectina, hemiceluloses, proteínas e elementos minerais, que torna tão difícil o processo de hidrólise deste composto (KOSARIC, 1988; COWLING & KIRK, 1976).

As hemiceluloses, localizadas entre as microfibrilas ou espaços interlamelares, são heteropolímeros de xilose, galactose, manose, arabinose e vários outros açúcares bem como seus ácidos urônicos. Depois da celulose eles são os mais abundantes materiais orgânicos sobre a terra. Xilano, um polímero linear de resíduos de β -D-xilopiranoses unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas, constitui o principal polissacarídeo da fração hemicelulose. Os Xilanos de diferentes espécies de plantas são disponíveis comercialmente e de acordo com sua origem, xilanos de madeira dura (angiosperma), madeira macia (gimnosperma) ou gramíneas têm diferentes substituintes. Os principais substituintes de xilano de gramíneas são unidades de arabinofuranosil ligadas à posição C-3 da cadeia principal (PULS, 1988) e pequenas porções de unidades de ácido glicurônico ou 4-O-metil éster na posição C-2, ou ambos. Contrariamente, em xilano de madeira, o principal grupo lateral substituinte é o ácido 4-O-metil- α -D-glicurônico. Adicionalmente xilano de madeira macia carrega pequenas porções de unidades de arabinofuranosil enquanto xilanos de madeira dura são acetilados (PULS, 1988) (figura 2). Por estas razões, a origem do xilano tem uma importante influência na natureza dos fragmentos resultantes

após a hidrólise.

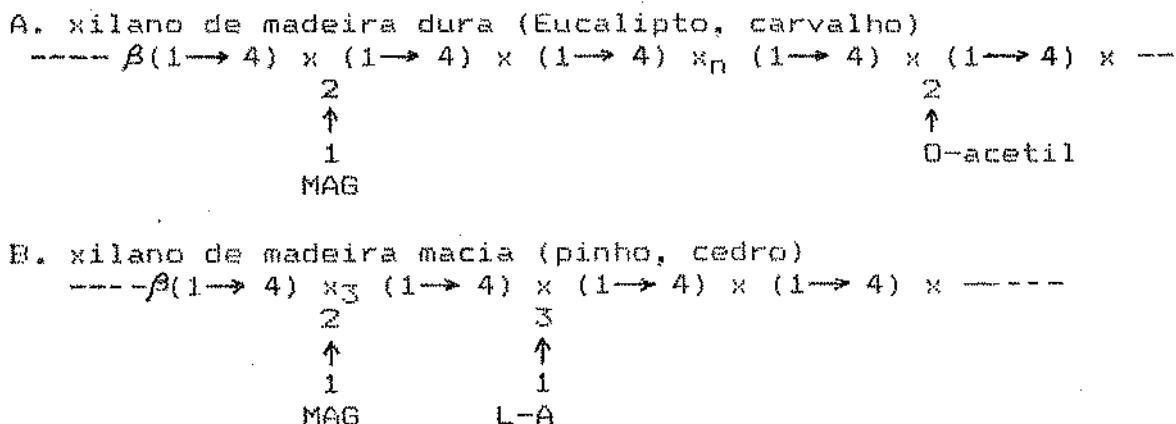


Figura 2: Estrutura representativa de xilanos (WOODWARD, 1984)

X, resíduo de β -D-xilopiranosil
 A, α -L-arabinofuranosil
 AMG, ácido-4-O-metil- α -D-glicurônico

A lignina, cuja matriz forma uma bainha protetora em torno da microfibrila de celulose é responsável, em grande parte, pela dificuldade inerente à hidrólise da celulose. Esta macromolécula possui natureza polifenólica e é produto da desidratação de três alcoóis monoméricos: trans-P-coumaril, trans-coniferil e trans-sinapil. As ligninas de madeiras macias, madeiras duras e gramíneas são diferentes em composição, principalmente no grupo metoxila substituinte e no grau de ligação entre os grupos fenólicos. Entretanto suas características estruturais comuns predominam e a estrutura esquemática da lignina de coníferas mostradas na figura 3 apresenta todas as características importantes para sua utilização química (GOLDSTEIN, 1976).

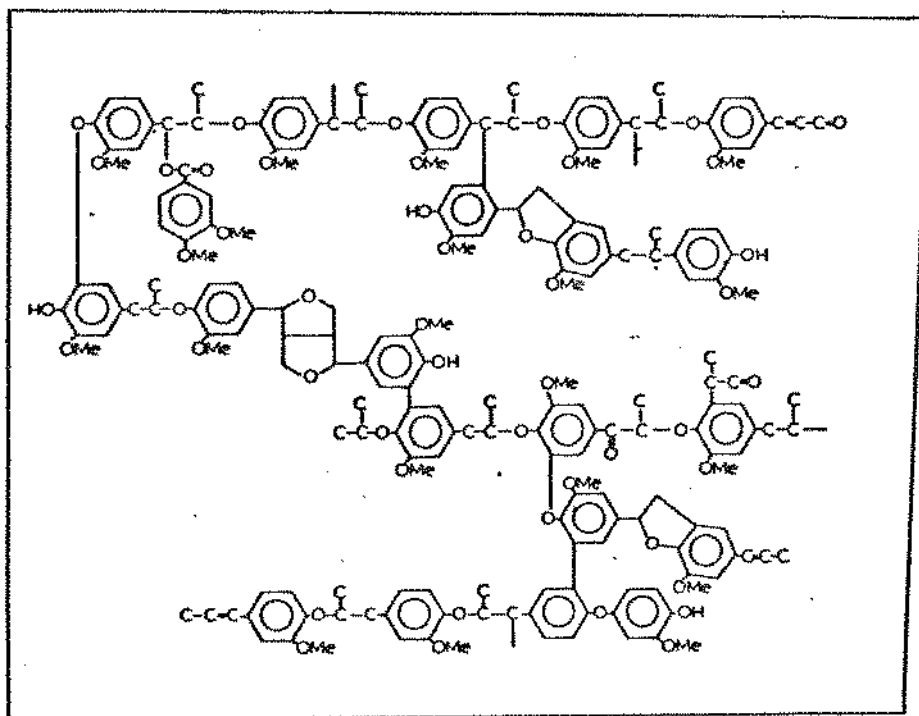


Figura 3: Estrutura química representativa da molécula de lignina (GOLDSTEIN, 1976).

2.3. HEMICELULASES

As hemiceluloses constituem de 10 a 40% do peso de madeiras e resíduos agrícolas, por isto servem como uma abundante e barata fonte de carboidratos fermentescíveis. O Xilano é o principal componente da fração de hemicelulose. A utilização eficiente do xilano de biomassa lignocelulósica é imprescindível se o objetivo é viabilizar economicamente os processos de bioconversão da madeira buscando produzir substratos para fermentação alcoólica ou insumos para a indústria de alimentos, tais como o adoçante não cariogênico xilitol sendo necessário para isto, hidrólise ou uso de xilanases. Além disso, as xilanases podem ser utilizadas em sucos de frutas para facilitar sua clarificação (BECK & SCOTT, 1974; JURASEK & PAICE, 1988b). Nos anos 80 cresceu o interesse pela aplicação de xilanases para a remoção de hemiceluloses na produção de polpa de papel ou de raíom (PAICE & JURASEK, 1984). Sabe-se que na indústria de polpa e papel, as hemiceluloses afetam as propriedades do papel (JURASEK & PAICE, 1988a). A natureza precisa desta interferência é desconhecida (ROBERTS et alii, 1990). O uso controlado e seletivo do tipo de xilanase na fabricação do papel poderia contribuir tanto para melhorar as propriedades do papel (PAICE et alii, 1988; ROBERTS et alii, 1990) quanto para reduzir a contaminação por dioxina (derivado do cloro, que é usado no processo de branqueamento), nos efluentes desta indústria (VIKARI, 1986).

Vários trabalhos publicados demonstraram a viabilidade técnica de se usar xilanases extracelulares produzidas por fungos

para promover a hidrólise enzimática das hemiceluloses, ou hidrólise combinada com processos físicos ou químicos e posterior fermentação, dos mono e oligossacarídeos liberados (WOODWARD, 1984; KOSARICK et alii, 1988, PULS, 1988).

As hemiceluloses são constituídas predominantemente pelo xilano, um polímero de xilose com cadeias laterais de arabinose, ácidos glicurônicos, grupos acetilas ou glicose (WHISTLER & RICHARDS, 1970; BIELY, 1985). A degradação total do xilano inclui as enzimas que degradam o esqueleto formado pelos resíduos de D-xilose (as xilanases) e aquelas que atuam nos resíduos substituintes nas ramificações do esqueleto. O grupo das enzimas desramificantes é formado pela: a) L- α -arabinofuranosidase, que remove a L-arabinose substituída no C₃ da unidade de xilose da cadeia de xilano (JOHNSON et al, 1988; KOMAE et alii, 1982; KAJI et alii, 1981); b) uma acetilxilano esterase que remove os O-acetil substituintes de cadeia xilanosídica (BIELY et al, 1988); c) uma α -glicuronidase que remove os resíduos de 4-O-metil ácido glicurônico substituintes (FONTANA et alii, 1988) e d) uma α -glicosidase, que remove os grupos de D-glicose da molécula de xilano. Por outro lado, as xilanases são constituídas por dois componentes: a) a endoxilanase, que quebra o polímero aleatoriamente, produzindo fragmentos com vários comprimentos e b) a β -D-xilosidase, que é responsável pela degradação dos xilooligossacarídeos, liberados no decorrer da hidrólise pela endoxilanase, até xilose (JOHN & SCHMIDT, 1988; MATSUDO & YASUI, 1988; YASUI & MATSUO, 1988; MISHRA & RAO, 1985; LEE & FORSBERG, 1987; WONG et alii, 1988). Um terceiro componente foi relatado por BIELY (1985) e corresponde a uma exoxilanase que degrada a cadeia do xilano a partir da extremidade não redutora

produzindo xilose livre mais um fragmento de xilooligossacarídeo final. Embora haja citações na literatura de isolamento de exo-D-xilanases de fungos, tais enzimas são difíceis de se distinguir das β -D-xilosidases, porque ambas são capazes de degradar xilooligossacarídeo de D.P maior que 2, e, por definição apenas a primeira deveria ser capaz de atacar D-xilano (DEKKER & RICHARDS, 1975). As duas enzimas podem ser distinguidas uma da outra por análise de espectroscopia de ressonância magnética, que determinaria a configuração do resíduo de xilose liberado. A retenção da configuração indicaria uma β -xilosidase, e a inversão da configuração, uma exoxilanase (DEKKER, 1975; WOODWARD, 1984).

A enzima do tipo exo atuando sobre o xilano nativo não foi ainda bem caracterizada de forma inequívoca (LACHKE, 1988). Os trabalhos relatando este tipo de ação de exoxilanase, mostraram também presença de endoxilanases nas preparações (DEKKER & RICHARDS, 1975) e como estas exoxilanases não foram extensivamente purificadas não é certo se esta enzima parcialmente purificada seria realmente exoxilanase, porque o mesmo resultado poderia ser obtido se a preparação parcialmente purificada, consistisse de uma mistura de β -xilosidase e endoxilanase (DEKKER & RICHARDS, 1975). Considerando que os xilanos, in situ, são polissacarídeos altamente ramificados, a contribuição da exoxilanase sobre a hidrólise do mesmo seria bastante limitada, já que sua ação terminaria ao atingir um ponto de ramificação. Entretanto, tais limitações estariam na dependência do ataque delas sobre o xilano ter sido precedido, ou não, pela ação de uma enzima desramificante (DEKKER, 1985).

A maioria das informações disponíveis relativas a propriedades das xilanases foram originadas de enzimas produzidas por bactérias e fungos mesófilos. A maior parte dessas enzimas possui pH ótimo entre 4,0 e 7,0, são estáveis entre pH 2,0 e 9,0 e apresentam temperatura ótima entre 40°C e 50°C com estabilidade térmica na faixa de 40 a 50°C (WOODWARD, 1984).

O grande problema no emprego das enzimas de organismos mesófilos, contudo, é que estas geralmente sofrem desnaturação em temperaturas maiores que 55°C. Isto, por sua vez, resulta em baixa eficiência de hidrólise, exigência de maior quantidade de enzima e aumento no custo para conduzir a hidrólise sob condições assépticas (DURAND et alii, 1984).

Existem algumas exceções a esta regra. DEKKER & RICHARDS (1976), por exemplo, relataram a ocorrência de um sistema de xilanase (HC-II) produzido pelo fungo mesófilo patogênico Ceratocystis paradoxa, que apresentou algumas propriedades não comuns a organismos mesófilos. A xilanase HC-II purificada deste fungo apresentou temperatura ótima elevada, 80°C, e estabilidade térmica a 60°C por uma hora, sendo completamente inativada apenas a 100°C por uma hora em pH 5,5. Mesmo na presença de EDTA, esta enzima manteve sua estabilidade térmica, sugerindo que íons metálicos polivalentes podem não estar envolvidos na estabilização da proteína.

O emprego de xilanases termoestáveis para realizar hidrólise a temperaturas mais elevadas é vantajoso porque aumenta a velocidade de reação e evita contaminação microbiana contribuindo assim para aumentar a viabilidade técnica e econômica do processo

(DURAND et alii, 1984; YU, 1987).

Assim, as pesquisas sobre xilanases termoestáveis mereceram grande atenção e o volume de pesquisas cresceu rapidamente.

MATSUO et alii (1977a, 1977b, 1981) estão entre os primeiros autores que descreveram, numa série de trabalhos, o isolamento do fungo termófilo celulolítico Malbranchea pulchella var. sulfurea, bem como a purificação e as propriedades de uma β -xilosidase produzida. Mais tarde, MATSUO & YASUI (1985), ainda trabalhando com o mesmo fungo descreveram a purificação e propriedades de uma endoxilanase termoestável. A xilanase foi purificada 139 vezes a partir do filtrado por fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-Celulose e CM-Sephadex, com um rendimento de 42,8%. A enzima purificada apresentou pH ótimo entre 6,0 e 6,5 e temperatura ótima a 70°C.

KOMURA et alii (1978) isolaram e patentearam uma linhagem de fungo termófilo celulítico que apresentava alta produção de celulasas e xilanases. Esta linhagem foi classificada como Sporotrichum cellulophilum. No mesmo ano SHINNER & TOKUYAMA (1978), também patentearam uma linhagem do fungo termófilo Thielavia terrestris a qual foi postulada apresentar alta produção de celulasas e xilanases. Alguns anos depois DURAND et alii (1984), considerando estas linhagens termófilas como as mais promissoras, realizaram um estudo comparativo de celulasas e hemicelulasas entre os fungos mesófilos Trichoderma reesei e Penicillium sp e os fungos termófilos Thielavia terrestris e Sporotrichum cellulophilum. Seus resultados, apresentados na seguinte ordem: T. reesei, Penicillium sp,

I. terrestris e S. cellulophilum, foram: a) atividade específica, endoxilanase: 100, 60, 60 e 80; xilosidase: 100, 10, 70 e 10; b) meia-vida a 60°C (estabilidade térmica), endoxilanase: 1,6; 0,8; maior que 72 e 11 horas; xilosidase: 3,0; 0,6, maior que 72 e 2 horas. c) Temperatura ótima (°C), endoxilanase: 55, 55, maior que 75 e 70°C; xilosidase: 60, 60, 65 e 60°C; d) pH ótimo, todos foram muito próximos a 5,0. Os resultados demonstraram claramente a superioridade do I. reesei quanto à atividade específica para endo e exoxilanase. Pouca diferença foi observada quanto a estabilidade térmica e temperatura ótima entre os organismos mesófilos e o termófilo S. cellulophilum, mas é significativamente melhor a estabilidade térmica e a temperatura ótima do fungo I. terrestris com relação aos demais, conforme observa o autor.

De acordo com DECKER & RICHARDS (1976), a ocorrência de várias formas de xilanases durante o processo de purificação foram demonstradas. A exata interrelação entre estas formas de enzimas não é clara, e não se sabe se elas são produtos de genes diferentes.

YOSHIOKA et alii (1981) relataram que a xilanase termoestável de Talaromyces byssoclamidoides YH-50, foi fracionada em três componentes durante sua purificação. Cada fração foi purificada até a homogeneidade e denominadas de X-a, X-b-I e X-b-II. Elas eram glicoproteínas contendo 36,5, 31,5 e 14,2% de resíduos de carboidratos respectivamente. As três enzimas tinham temperatura ótima na faixa de 70 a 75°C e retinham 65, 54 e 30%, respectivamente, da atividade original após aquecimento a 95°C por 5 minutos. O pH ótimo estava na faixa de 4,5 a 5,5 e os resultados de

hidrólise do xilano mostraram que as três eram endoenzimas.

KITPREECHAVANICK et alii (1984) descreveram a purificação e as propriedades de uma xilanase de Humicola lanuginosa, cultivado em meio de farelo de trigo. A enzima purificada apresentou peso molecular de 21.000 Da com Ponto Isoelétrico em 4,1. O pH ótimo foi 6,0 e a temperatura ótima foi 65°C. A hidrólise do xilano deu como produtos xilose (pequena quantidade), xilobiose e xilotriose indicando ação de endoenzima.

MCCARTHY & CROSS (1984), estudando o actinomiceto termófilo Saccharomonospora viridis relataram a produção de xilanase extracelular e ausência de atividades celulases exo e endoglucanase. ROBERTS et alii (1990), acharam que este organismo apresentava um modelo enzimático adequado para produção de preparações brutas de xilanases livres de celulases, ideal para tratamento de polpa de celulose. Seus resultados demonstraram uma remoção seletiva de aproximadamente 20% do xilano total. Folhas de papel (Handsheets) preparadas a partir da polpa tratada desta forma demonstraram modificações em propriedades físicas tais como decréscimo no fator de ruptura (burst factor) e expansão (long span breaking length) sugerindo um decréscimo nas ligações interfibras.

RISTROPH & HUMPHREY (1985) relataram a caracterização de uma preparação bruta de xilanases da bactéria termófila Thermomonospora sp. O pH ótimo situou-se na faixa de 5,5. a 7,7 e a temperatura ótima foi de 80°C. A enzima bruta apresentou uma meia-vida (estabilidade térmica) de um mês quando incubada a 55°C em pH 6,5. A ação da enzima bruta sobre xilano também produziu uma mistura de

xilose (traços) e xilobiose, sugerindo ação de endoenzima presente.

BERENGER et alii (1985) descreveram a produção, purificação e algumas características da enzima da bactéria celulolítica termófila anaeróbica e esporulante Clostridium stercorarium. Neste trabalho os autores verificaram que a síntese de xilanase sofria repressão catabólica quando glicose ou outros substratos rapidamente metabolizáveis eram adicionados durante o crescimento em xilano ou celulose. Três xilanases A, B e C foram purificadas até a homogeneidade. As enzimas A, B e C apresentaram pH ótimo na faixa de 5,5 a 7,0, e temperatura ótima a 75°C. As três enzimas se mostraram estáveis na faixa de pH 7,0 a 12,0 (4°C por 24 h) mas em pH 3,0 as xilanases B e C perderam 50% de suas atividades e a enzima A mostrou-se menos estável, perdendo 50% da atividade em pH 5,5. Quanto à termoestabilidade, A e C foram estáveis a 75°C por 1 hora e B reteve 85% da atividade, nas mesmas condições. As enzimas foram inibidas por Hg⁺² e p-cloromercuriobenzoato. O padrão de hidrólise de xilano mostrou que as três eram endoenzimas, produzindo xilobiose e xilotriose como produtos principais.

MCCARTHY et alii (1985) realizaram um estudo sobre a atividade de xilanase bruta de quatro actinomicetos termófilos, anteriormente isolados por McCARTH & CROSS (1984). As espécies foram classificadas como Thermonospora fusca, Thermonospora curvata, Thermonospora chromogenea e Saccharomonospora viridis. As quatro xilanases tinham atividade ótima dentro da faixa de temperatura de 60°C - 70°C e na faixa de pH de 5,0 a 8,0. Os sobrenadantes dos meios de cultura fermentados pelas linhagens de Thermonosporas in-

incubados a 70°C por 11 horas retinham mais que 80% de suas atividades enquanto que o sobrenadante do cultivo da Sacharomonospora foi quase totalmente inativado nestas condições. Todas as linhagens produziram xilanases que hidrolisaram xilano resultando em uma mistura de xilooligossacarídeos, mas por tempo prolongado de hidrólise as enzimas de I. fusca e I. curvata produziram principalmente xilose, indicando presença de atividade β -xilosidase. Dentre todas, a linhagem mais ativa foi I. curvata que produziu xilose a partir de farelo de trigo moído.

MAHESHWARI e KAMALAN (1985) relataram o isolamento, na Índia, a partir de solos e de compostagens, de um fungo termófilo Melanocarpus albomyces. Foram estudadas as condições de cultivo, a produção e a atividade de xilanase. O extrato enzimático, obtido a partir de crescimento com xilose ou bagaço de cana, não produziu significativa atividade de celulase ou de β -glicosidase. A cultura produziu maior rendimento de enzima quando fermentada em frasco agitado do que em fermentador. Purificação parcial do caldo de fermentação filtrado em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e coluna de Sephadex G-75 mostrou a presença de duas isoenzimas da xilanase. A atividade de xilanase nas preparações foi aumentada pela adição de β -glicosidase ou celulase exógena.

O estudo de xilanases de Bacillus sp termófilos e alcalofílicos foi iniciado pelo grupo de Horikoshi no Japão (OKAZAKI et alii, 1984) que descreveram o isolamento de quatro linhagens de Bacillus sp que produziam xilanases em quantidades significativas quando cresciam em meio alcalino (pH 10) a 50°C. Posteriormente o mesmo grupo (OKAZAKI et alii, 1985) relatou a purificação e caracte-

terização das enzimas a partir de duas das linhagens selecionadas denominadas W1 e W2. A cromatografia em DEAE-Toyopearl 650M revelou que as duas linhagens produziam dois componentes xilanolíticos, que foram denominados I e II. Os componentes I não foram adsorvidos na resina enquanto os componentes II foram adsorvidos e eluídos com gradiente de concentração de NaCl. Os componentes I apresentaram propriedades similares: pH ótimo 6,0; temperatura ótima 65°C; peso molecular de 21.500 (linhagem W1) e 22.500 (linhagem W2). Os componentes II também apresentaram propriedades similares: pH ótimo 7,0 - 9,0 (W1) e 7,0 - 9,5 (W2); temperatura ótima 70°C; peso molecular 49.500 (W1) e 50.000 (W2). As atividades dos componentes I e II foram inibidas por Hg⁺⁺ e Cu⁺⁺. Os componentes I hidrolisaram xilano produzindo xilobiose e oligossacarídeos maiores sem produzir xilose, sugerindo serem endoxilanases típicas. Por outro lado os componentes II produziram xilose, xilobiose e outros xilooligossacarídeos, sugerindo ação típica de endoxilanase formadora de xilose.

GRUNINGER & FIECHTER (1986) relataram o isolamento, a partir de esgoto tratado termicamente (50 - 67°C), de uma linhagem termófila de Bacillus stearothermophilus, produtora de xilanase termoestável. A enzima bruta apresentou temperatura ótima a 78°C e pH ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. A meia vida a 75°C foi de 15 horas, entretanto a 68°C ela permaneceu estável por mais de 5 dias. A produção de xilanase não foi associada com o crescimento celular. A hidrólise de xilano, mostrou produção de xilobiose e xilotriose, enquanto a xilose apareceu apenas após prolongado período de incubação.

Em 1987 o grupo de Saddler no Canadá (YU et alii, 1987) estudou a produção de xilanase de 31 linhagens de fungos termófilos em meio sólido ou líquido contendo diferentes substratos hemi-celulósicos e celulósicos. Uma linhagem de Thermoascus aurantiacus C436 consagrou-se a melhor produtora de xilanase extracelular. A enzima bruta, mostrou temperatura ótima a 75°C e pH ótimo em torno de 5,0. A meia-vida (termoestabilidade) da atividade de xilanase a 70°C e 60°C foi de 1,5 hora e 4 dias, respectivamente.

Este mesmo grupo, em outro trabalho, (TAN et alii, 1987) relatou a purificação e caracterização da xilanase termoestável do T. aurantiacus C436. Uma proteína com atividade enzimática foi purificada usando um único passo cromatográfico em SP-Sephadex C-50 (trocador catiônico) mostrando homogeneidade em SDS-PAGE. A enzima foi adsorvida na resina e eluída com gradiente salino. Seu peso molecular foi 32.000 Da e o ponto isoelétrico foi pH 7,1. O pH e temperatura ótima foram 5,1 e 80°C, respectivamente. A atividade enzimática foi totalmente recuperada após incubação a 60°C por 97 horas ou incubação a 70°C por 24 horas. A meia-vida da enzima foi 54 minutos a 80°C. Através da análise dos produtos de hidrólise do xilano, os autores deduziram que esta enzima age sobre o xilano por um mecanismo de ação endo.

GANJU et alii (1989) isolaram uma linhagem do fungo termófilo Chaetomium thermophile var. coprophile a partir de solos de florestas na Índia. O fracionamento do sistema de enzimas xilanolíticas deste fungo por cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50, revelou que ele possuía cinco diferentes formas de xilanases extracelulares. As frações não adsorvidas no trocador aniônico fo-

ram juntadas para cromatografia em coluna de Sephadex G-75 obtendo-se a separação de duas formas de xilanases I e II. Seus pesos moleculares foram 26.000 Da e 70.000 Da, respectivamente. As temperaturas ótimas e pH ótimos foram 70 e 60°C e pH 4,8 - 6,4 e 5,4 - 6,0, respectivamente. A xilanase I foi mais termoestável que xilanase II. A análise dos produtos de hidrólise do xilano mostraram que a xilanase I liberou principalmente xilobiose, xilotriose e pequenas quantidades de outros xilooligossacarídeos indicando atividade de endoxilanase. A xilanase II produziu principalmente xilobiose, indicando que a enzima degrada o xilano removendo uma molécula de xilobiose por vez.

SAKKA et alii (1991) descreveram a purificação e as propriedades de xilanases de Clostridium stercoarium linhagem HX-1. O sobrenadante do meio de cultura foi fracionado em cromatografia de DEAE-Sephadex A-50 e Butil-Toyopearl com uma purificação de 19 vezes e recuperação de 41% da atividade total. A enzima foi homogênea em SDS-PAGE. O peso molecular foi 53.000; Ponto Isoelétrico 4,5; pH ótimo 6,5; temperatura ótima 76°C; estável entre pH 5,0 a 10,0 (24h a 4°C) e estável a temperatura de 70°C por uma hora. Resultados da hidrólise de xilano pela xilanase indicaram que ela atua como uma endoxilanase, quebrando aleatoriamente o xilano.

MONTI et alii (1991) relataram a purificação e as propriedades de uma xilanase extracelular do fungo termófilo Humicola grisea var. thermoidea isolado de solo brasileiro. O fracionamento do sobrenadante do meio de cultivo filtrado, em cromatografia em coluna de DEAE-Celulose mostrou duas formas de xilanases 1 e 2. A forma 1 não se ligou à resina enquanto a forma 2 se ligou à resina

fracamente. A forma 2 foi purificada até a homogeneidade em coluna de Sephadex 6-200. Após purificação, seu peso molecular foi de 23.000 e 25.500 Da por filtração em Bio-Gel P-60 e Urea-SDS-PAGE, respectivamente. A enzima era uma glicoproteína com 45% de carboidrato e o pH e temperatura ótimos foram 5,5 e 70°C, respectivamente. Os produtos da degradação do xilano pela xilanase 2 indicaram que ela é uma endoenzima. A incubação da xilanase 1 (parcialmente purificada) com os produtos da hidrólise do xilano pela forma 2, mostrou que a forma 1 degrada ainda mais estes produtos. O mesmo procedimento com a forma 2 não degradou mais os produtos da hidrólise da forma 1. O modo de ação da forma 1 não foi esclarecido.

2.4. CELULASES

O estudo das enzimas do complexo multienzimático celulolítico constitui uma das mais brilhantes seqüências de evolução do conhecimento científico proporcionado pela bioquímica. Isto é, o conceito do mecanismo de ação das enzimas celulases do complexo celulolítico descrito no passado foi se modificando à medida que técnicas bioquímicas foram aprimoradas e novas metodologias e insumos foram introduzidos ao rol dos já existentes. Particularmente importante, foi o desenvolvimento dos processos de purificação de proteínas ocorrido neste período.

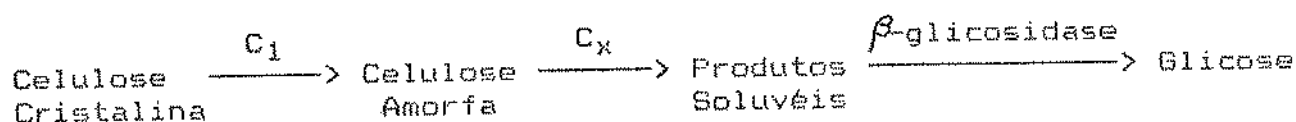
A história das celulases está ligada às Forças Armadas Americanas por intermédio do U.S. Army Natick Development Center, em Natick, Massachusetts - USA, e sua importância e estudos começaram durante a 2ª. Guerra Mundial. Neste período o exército americano ficou preocupado com a rapidez com que seus materiais bélicos sofriam deterioração no extremo oriente, sobretudo os derivados de celulose: tecidos, roupas, sacos, etc. Criou-se então, um programa básico para determinar a natureza da deterioração, o agente causal, modo de ação e métodos de prevenção (REESE, 1976). Desde então, as pesquisas com microrganismos celulolíticos não pararam mais.

O trabalho do grupo, liderado por Elwyn T. Reese tinha a função de isolar cepas de microrganismos a partir de materiais celulósicos em decomposição e selecionar as cepas capazes de degradar a celulose. As cepas mais ativas foram testadas quanto a sua habilidade de produzir enzimas que hidrolisassem a celulose. Des-

tes estudos concluiu-se que a degradação da celulose não era realizada por uma única enzima mas por um complexo enzimático que variava de microrganismo para microrganismo. Também foi constatado que a enzima podia ser endocelular ou extracelular e que a ação sobre a celulose variava dependendo da forma (celulose nativa, tratada etc) como o substrato era usado (REESE, 1976). Este foi sem dúvida um período de grande atividade e produção científica pelo grupo de Natick e dentre os vários microrganismos selecionados, um isolado originado da Nova Guiné, apresentou uma notável habilidade para acumular enzimas do complexo celulolítico no meio de cultura e foi classificado como Trichoderma viride QM6a. Mais tarde este microrganismo e seus descendentes viriam a se chamar Trichoderma reesei Simmons (SIMMONS, 1977) em homenagem a Elwyn T. Reese, o primeiro a reconhecer a habilidade única deste microrganismo em secretar alto nível de atividade celulolítica e também por sua dedicação de tantos anos ao estudo das celulases (MANDELS, 1982).

Desde aquela época o T. reesei é considerado um dos microrganismos mais apropriados para a produção de celulases e tem sido objeto de estudo da grande maioria dos pesquisadores desta área. Assim, várias formas mutantes deste microrganismo foram desenvolvidas para aumentar ainda mais a produção enzimática. O mutante QM 9414, disponível a partir de 1971, é a forma mais amplamente usada em processos de pesquisas e desenvolvimento. Entretanto, muitos dos novos mutantes não foram liberados para distribuição geral (MANDELS, 1982).

REESE et alii (1950), foram os primeiros a sugerirem um mecanismo para a quebra enzimática da celulose o qual envolvia um componente C_1 e um C_x . Fundamentalmente, a conversão da celulose nativa a açúcares solúveis era realizada por um processo de dois passos. Ele postulou que a ação de C_1 era o primeiro passo e que isto era meramente uma preparação para a hidrólise, ou seja a enzima C_1 primeiro atacava a celulose cristalina, modificando-a ou desagregando-a (celulose amorfa) de tal forma que a enzima classificada como C_x pudesse causar a despolimerização ou hidrólise das cadeias de celuloses, conforme o esquema abaixo:



C_1 , por ser primeira enzima a agir sobre a celulose cristalina C_x , sendo 1,4 glucanase. "x" refletindo o fato de existirem vários de tais componentes.

β -glicosidase, que converte celobiose e celotriose a glicose.

De acordo com REESE et alii (1950) microrganismos que pudessem crescer apenas sobre formas solúveis de celulose, tal como carboximetilcelulose, sintetizavam apenas o componente C_x , enquanto microrganismos capazes de crescerem em formas altamente ordenadas da celulose (cristalina), produziam tanto C_1 quanto C_x .

A hipótese de Reese não foi contestada durante muito tempo porque os microrganismos celulolíticos estudados na época, tais como Myrothecium verrucaria e Stachybotrys atra, embora digerssem a celulose nativa, quando eram analisados os filtrados do cultivo livre de células apresentavam atividade apenas para hidro-

lisar a forma solúvel da celulose, CMC ou celulose tratada, e estas formas, eram hidrolisadas pela C_x (WOOD, 1972). Por isto pensava-se que o componente " C_1 " era o responsável pela modificação da celulose nativa, possibilitando a ação de C_x . Na verdade, estes microrganismos produzem endo- β -glucanase (C_x) mas não a exo- β -glucanase (MANDELS et alii 1976). Isto também é verdadeiro para preparações de celulases derivadas de muitos outros microrganismos como por exemplo, Aspergillus niger (MANDELS et alii 1976).

A descoberta, no período entre 1964-1965, que filtrados de cultura preparados a partir de certas linhagens de Trichoderma viride e T. koningii produzem o sistema completo de celulases necessárias para hidrolisar totalmente a celulose cristalina causou uma mudança de rumos nos estudos das celulases. Apenas a partir daí, começaram verdadeiramente as pesquisas sobre o componente C_1 ou exo- β -glucanase. (WOOD, 1972 e MANDELS et alii, 1982).

A partir do trabalho de WOOD em 1972 com T. koningii, obtendo sucesso na purificação de uma enzima, que ele acreditava ser C_1 , em coluna de resina trocadora de ions (DEAE-Sephadex) e eletrofocalização, dois importantes dados foram revelados:

- a) A celobiose era o principal produto da ação de " C_1 " ou seja " C_1 " era uma celobiosil hidrolase (celobiohidrolase).
- b) " C_1 " sozinha não podia atacar celulose cristalina mas podia fazê-lo se C_x estivesse presente.

Em 1972 pesquisadores japoneses (NISIZAWA et alii, 1972) em função das dúvidas existentes no conceito C_1 - C_x , introduziram os termos atividade de avicelase e atividade de CMCase para enzi-

mas que degradavam o avicel (celulose microcristalina) e a carboximetilcelulose (celulose modificada), respectivamente.

O uso de C_1 como sinônimo de $\text{exo-}\beta(1\rightarrow4)$ glucanase foi, cada vez mais, sendo abandonado por ser enganoso (MANDELS, 1982).

Desde então muitos outros trabalhos publicados trouxeram evidências, que mudaram o conceito original de Reese. Embora, ainda hoje, haja consideráveis diferenças nas opiniões relacionadas a especificidade das várias enzimas e o papel que elas desempenham na dissolução da celulose nas suas várias formas, alguma generalização relacionada ao modo de ação e propriedades dos componentes individuais do sistema celulasas pode ser feita.

Existem três tipos principais de enzimas encontradas no sistema celulasas que podem degradar a celulose cristalina: $\text{exo-}\beta$ -glucanase, $\text{endo-}\beta$ -glucanase e β -glicosidase (ERIKSON & WOOD, 1985).

O mecanismo de ação do sistema celulase que parece mais provável é que primeiramente atue uma endoglucanase produzindo cadeias terminais livres que servem de substrato para a exoglucanase que libera glicose mais uma mistura de pequenos oligossacarídeos (celobiose principalmente) que são hidrolisados pela β -glicosidase (BISARIA & GHOSE, 1981). Figura 4.

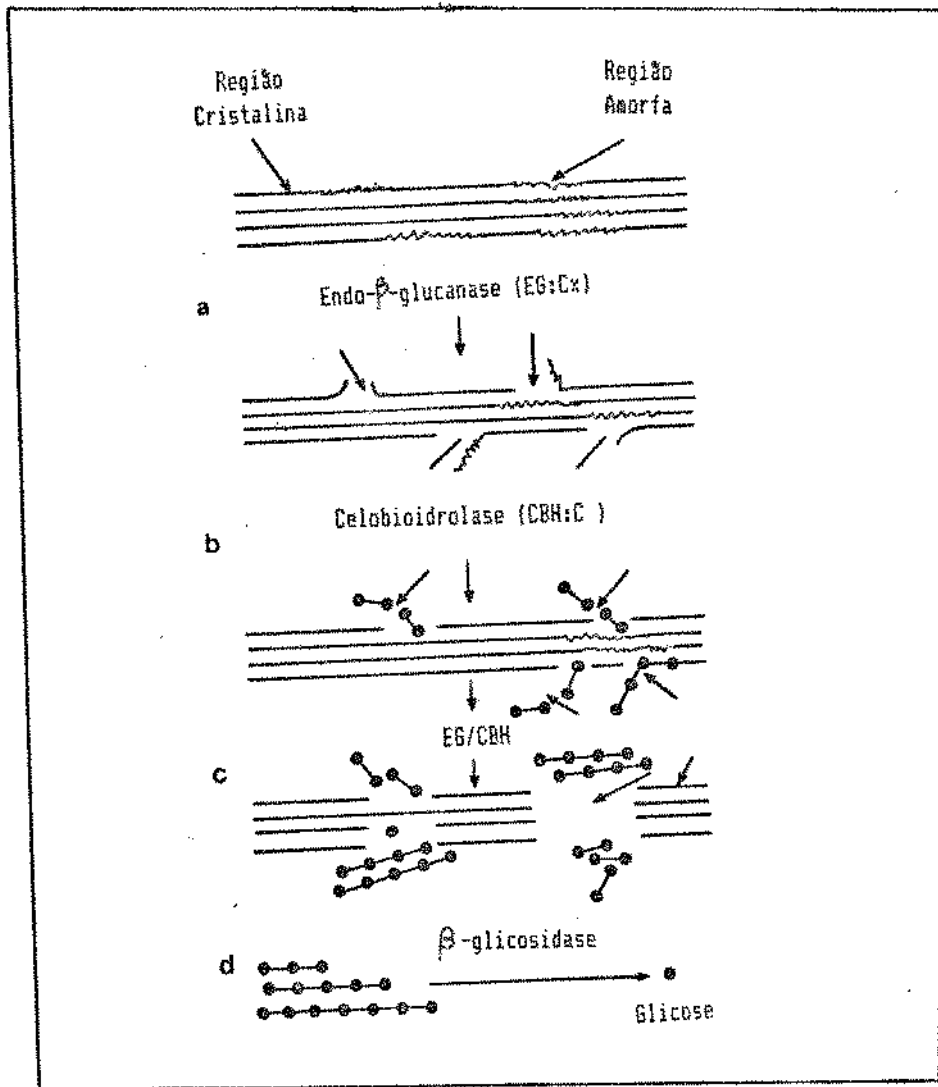


Figura 4: Representação esquemática da ação sinérgica de enzimas envolvidas na degradação de celulose (BISARIA & GHOSE, 1981).

•, glicose livre; •—•, celobiose

Celulase não é uma única enzima, mas um sistema único no qual várias enzimas agem em conjunto para completar a hidrólise da celulose, a qual, nenhuma delas, atuando sozinha, pode conseguir (BISARIA & GHOSE, 1981). Muitos dos fungos celulolíticos parecem ter sistema de celulases similares, mas variando nas concentrações que dos componentes do sistema que são acumulados no meio de fermentação.

MANDELS (1982), afirma que celobiase ou β -glicosidase não é uma celulase e pode ser produzida por organismos não celulolíticos. Esta enzima aumenta a ação da celulase porque remove a celobiose inibidora deste sistema.

Há um número praticamente incontável de relatos sobre celulases de vários microrganismos celulolíticos, principalmente os organismos mesófilos. Os sistemas de celulases fúngicas mais ativos e estudados são dos fungos *T. reesei*, *T. lignorum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. longibrachiatum*.

Segundo Mandels (1982) o uso do *T. reesei* como fonte de celulases apresenta vantagens e desvantagens. Como vantagens podem ser citadas: a) produz um sistema de celulases completo, com todos os componentes necessários para hidrólise total da celulose cristalina. b) alta concentração de celulases é obtida no meio de fermentação. As desvantagens são: a) sensibilidade a temperaturas acima de 50°C. b) incapacidade de degradar lignina. c) baixa atividade específica das celulases e d) baixo nível de β -glicosidase. As pesquisas para novas e possivelmente melhores fontes continuam e dentre estas novas possibilidades estão as linhagens termó-

filas, cujas celulasas termoestáveis, com possibilidade de operar a temperaturas acima de 55°C, oferecem algumas vantagens como um aumento na velocidade de reação, e sistema enzimático estável por mais tempo (ROSENBERG, 1975). Além disso, a temperatura elevada de crescimento e a elevada temperatura de operação no ambiente industrial, associado a baixo pH exigido por estas celulasas, restringem o crescimento de microrganismos contaminantes (WOJTCZAK, 1987).

A estabilidade das celulasas em vários microrganismos já foram estudadas. Em geral as β -glicosidases e as endoglucanases são mais estáveis ao calor, pH extremo e inibidor químico, do que as exo-glucanases (REESE & MANDELS, 1980).

A β -glicosidase, desempenha um papel importante na degradação da celulose nativa a glicose e pode ser considerado como um possível fator limitante da velocidade de reação. Durante a sacarificação, a celulose cristalina é atacada por um sistema multienzimático presente na maioria dos microrganismos celulotíticos cuja ação libera celobiose como principal produto solúvel final que é subsequentemente hidrolisado à glicose pelo componente enzimático β -glicosidase. Em muitos fungos, por exemplo, *T. reesei*, celobiose inibe tanto celobiohidrolase quanto endoglucanase (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973) assim a β -glicosidase é importante na regulação da degradação enzimática da celulose.

ROY et alii (1989), descreveram a imobilização de β -glicosidase purificada de *Myceliophthora thermophila* D-14. A enzima foi imobilizada em suporte de Sepharose ativada com CNBr e fixado

por ligações cruzadas no gel de poliacrilamida. O sistema mostrou boa funcionalidade e estabilidade. A enzima solúvel apresentou temperatura ótima a 60°C enquanto a enzima imobilizada apresentou temperatura ótima a 70°C, mas o pH nos dois casos foi 4,8.

HAGERDAL et alii (1978), isolaram e estudaram as enzimas do sistema celulolítico do actinomiceto Thermoactinomyces sp (Thermonospora sp). Inicialmente mostraram que as enzimas extracelulares, CMCase e avicelase eram produzidas simultaneamente com o crescimento celular. Mais tarde (HAGERDAL et alii, 1980) demonstraram que este organismo produzia exo e endo- β -glucanases termoestáveis que eram fortemente inibidas por celobiose e também produzia uma β -glicosidase termicamente instável e ligada à parede celular.

A despeito do rendimento geralmente baixo de celulases extracelulares das bactérias, continua o interesse pelas bactérias celulolíticas. AVGERINDS & WANG (1980), relataram que Clostridium thermocellum, capaz de converter celulose diretamente a álcool, produziu uma grande quantidade de celulases extracelulares. Uma característica relevante desta enzima foi sua forte adsorção pelo substrato. A cromatografia em coluna de Bio Gel P-200 mostrou um único pico de proteína e a eletroforese PAGE deste pico produziu cinco bandas discretas. O complexo purificado tinha 9.9% de carboidratos. Não houve conclusão por parte dos autores se isto indicava glicoproteína estabilizando esta celulase termoestável ou representava celodextrinas fortemente ligadas ao sítio ativo da enzima.

HAYASHIDA & YOSHIOKA (1980a) relataram o isolamento e identificação de uma linhagem de fungo termófilo e celulítico, o qual eles classificaram como Hemicola isolens YH-8. Numa série de três trabalhos estes autores descreveram as propriedades da preparação enzimática bruta e o processo de purificação da avicelase e da CMCase (HAYASHIDA & YOSHIOKA, 1980b), da β -glicosidase (YOSHIOKA & HAYASHIDA, 1980), e também discutiram sobre a relação da parte glicosídica da proteína CMCase e Avicelase com a estabilidade térmica e estabilidade ao pH destas enzimas (HAYASHIDA & YOSHIOKA, 1980a). Nestes trabalhos eles relataram que o extrato bruto enzimático hidrolisava Avicel, CMC e papel-jornal a 90%, 45% e 35%, respectivamente, como glicose. As enzimas foram termoestáveis e especialmente a CMCase purificada foi altamente termoestável porque reteve 45% da atividade após aquecimento a 90°C por 5 minutos. O pH ótimo e temperatura ótima de ambas enzimas foram 5,0 e 50°C, respectivamente. A remoção da fração carboidrato da enzima, contudo, refletiu em perda significativa da estabilidade ao pH e da estabilidade térmica das enzimas. A β -glicosidase após purificação apresentou pH ótimo em 5,0, temperatura ótima a 50°C e o peso molecular estimado em SDS-PAGE foi de 250.000 Da.

QURESHI et alii (1980), isolaram 28 espécies de fungos termófilos e termotolerantes a partir de 274 amostras obtidas de diferentes regiões no Paquistão. Destas, 19 foram celulolíticas.

MOREIRA et alii (1981), estudaram o efeito de vários carboidratos na indução e repressão do sistema de celulases do actinomiceto Thermomonospora sp. Glicose reprimiu fortemente a síntese de celulases. Por outro lado celobiose, avicel e "solka floc" in-

duziram altos níveis de atividade em papel de filtro. Eles observaram também que o processo de indução era função não apenas da natureza do material celulósico usado mas também da sua concentração inicial.

MIHSRA et alii (1981), isolaram e classificaram o fungo termófilo Humicola lanuginosa e descreveram que ele degradava eficientemente a celulose.

YOSHIOKA et alii (1982), relataram a produção e purificação de um novo tipo de CMCase por um fungo termófilo identificado como Humicola grisea var. thermoidea YH-78. A linhagem tinha sido isolada a partir de compostagem e exibiu uma alta atividade CMCase no filtrado quando cresceu em meio de farelo de trigo a 50°C por 4 dias, entretanto a atividade avicelase foi baixa. A porcentagem de hidrólise de CMC pela enzima bruta a 50°C em 24 h foi de 45%. Estes autores consideraram esta CMCase como um novo tipo de enzima porque ela foi adsorvida em avicel. A CMCase adsorvida em avicel foi purificada por cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e filtrações em géis de Sephadex G-100 e G-200. A CMCase pura teve pH ótimo a 5,0 e temperatura ótima a 50°C.

CHAVES (1982), em trabalho realizado na UFV-MG, isolou a partir de compostagem, um microrganismo termófilo capaz de crescer em celulose microcristalina. A autora realizou estudos de caracterização fisiológica do mesmo e o classificou como Humicola sp. Este mesmo microrganismo foi usado por ARAÚJO et alii (1983) em estudo das propriedades da β -glicosidase extracelular e da ligada à parede celular. O fungo produziu quatro vezes mais β -glicosidase

extracelular que o I. reesei QM 9414 e apresentou significativa termoestabilidade.

Aspergillus fumigatus é um organismo comum em compostos de vários tipos e um grande número de relatos de celulases de linhagens mesófilas já foram divulgados. Recentemente surgiram publicações sobre linhagens termófilas capazes de produzir grande variedade de celulases de acordo com o tipo de substrato celulósico fornecido (STEWART & HEPTINSTALL, 1988). O organismo é conhecido como bom produtor de xilanases e de β -glicosidase, neste ponto superando I. reesei, (STEWART et alii, 1985).

HAYASHIDA & MO (1986), estudaram a produção e caracterização de uma endoglucanase que desintegrou avicel, produzida por um mutante (protease-negativa) de Hemicola grisea var. thermoidea YH-78. O peso molecular desta enzima foi 128.000 Da. Por outro lado, um outro mutante (Protease-positivo) produziu uma endoglucanase com peso molecular de 63.000 Da, que não hidrolisou avicel. Estes autores propuseram que as endoglucanases podiam ser divididas em dois grupos: as que degradam avicel e aquelas que não degradam avicel.

WOJTCZAK et alii (1987), realizaram um estudo comparativo da termoestabilidade de celulases de seis fungos termófilos e um mesófilo. Os fungos termófilos usados foram os seguintes: Thielavia terrestris 255B, Thielavia terrestris 255C, Aspergillus terreus Thom. 304A, Thermoascus aurantiacus 235E, Thermoascus aurantiacus 235F e Myceliophthora fergusi 264C. O fungo mesófilo foi o Trichoderma harzianum E 58. Os autores consideraram as linhagens

termófilas como autênticas, pois mostraram temperatura ótima de crescimento entre 45°C e 50°C e pouco ou nenhum crescimento ocorreu em temperaturas menores que 20°C. Por outro lado, a linhagem mesófila, cresceu bem a 20°C, com crescimento ótimo ocorrendo a 28°C, e nenhum crescimento foi notado a temperaturas acima de 35°C. Os resultados mostraram que apesar da alta temperatura de crescimento dos termófilos, nem todos apresentaram temperaturas ótimas muito maiores que a do fungo mesófilo. As enzimas testadas foram endoglucanase, β -glicosidase e atividade de papel de filtro. Dentre os termófilos a linhagem de maior temperatura ótima e termoestabilidade enzimática foi a *T. aurantiacus* 235E, enquanto *A. terreus* 304A apresentou as menores temperaturas. Em incubações prolongadas (mais de 24h) as linhagens termófilas demonstraram um maior potencial hidrolítico em função da maior termoestabilidade dos componentes do sistema de celulases.

MONTI, R. (1989) estudou uma cepa de fungo termófilo originalmente isolado de compostagem na UFV-MG e reisolado no laboratório da FFCLRP - USP. Este fungo foi identificado como *Hemicella grisea* var. *thermoidea* RP - 17. Os estudos de produção e regulação das enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico mostraram que em meio definido, o fosfato inibia a produção e a secreção das enzimas extracelulares. Extrato de levedura estimulou a produção da enzima em meio líquido com agitação e glicose afetou drasticamente a produção destas enzimas. A linhagem produziu alta atividade de xilanase que foi posteriormente purificada (MONTI et alii 1991). Os autores propuseram que a enzima extracelular têm comportamento diferente da enzima micelial.

ROY et alii (1990), descreveram a purificação e propriedades de uma endoglucanase extracelular a partir de Myceliophthora thermophila D-14. A enzima foi purificada em duas etapas de cromatografias em coluna de DEAE-Sephadex A-50 consecutivas. A enzima foi purificada 13,8 vezes e foi homogênea em SDS-PAGE. O pH e temperatura ótimas de atividade foram 4,8 e 65°C, respectivamente. A enzima foi inibida por Hg^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} e NH_4^+ e também por EDTA, sugerindo estrutura de metaloenzima para esta proteína.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. EQUIPAMENTOS

- Camara Climática, modelo 346 - FANEM.
- Estufas bacteriológicas, FANEM.
- Espectrofotômetro Perkin-Elmer, duplo feixe.
- Espectrofotômetro Coleman, modelo 295
- Banhos de água com temperatura controlada, FANEM.
- Potenciometro Digimed.
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21B
- Coletor de frações Buchler, modelo Fractometer Alpha 200.
- Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC), marca Waters.
- Aparelho micro-compacto para eletroforese com cuba e fonte elétrica.
- Bomba de vácuo ligada a kitassato com funil e adaptados para filtração.

3.1.2. REAGENTES

Todos os reagentes foram de grau de pureza analítica desejável e suas origens são indicadas quando citados pela primeira vez nos textos.

Os ingredientes dos meios de cultura foram das marcas Merck, Difco ou Biobrás e as formulações foram preparadas mantendo-se sempre as mesmas marcas dos ingredientes usados.

3.1.3. MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DAS ENZIMAS

3.1.3.1 .Meio Sólido (M-1)

O meio sólido foi preparado misturando-se farelo de trigo com água destilada na proporção de 1:1, seguido de homogeneização manual. Para cada 20g do meio era utilizado um frasco Erlenmeyer de 500ml. Após esterilização a 120°C por 15 minutos os frascos eram inoculados com uma suspensão de conídios (10^7 células/ml) e incubados a 50°C por 4 dias para a produção rotineira de enzima ou por tempos variados conforme necessário.

3.1.3.2. Meio Líquido (M-2) Ref. MANDELS & STERNBERG (1976)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14g
KH ₂ PO ₄	0,20g
CaCl ₂	0,03g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02g
Peptona	0,10g
Solução de sais minerais .	1,00ml
Twen 80	0,10ml
Urea	0,03g
Carbono*.....	1,00g
Água destilada qsp	100,00ml
pH 5 a 6	

* xilano ou celulose

Solução de Sais Minerais (A)

FeSO ₄ .7H ₂ O	50,0mg
MnSO ₄ .3H ₂ O	16,0mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	14,0mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	20,0mg
Água destilada qsp ...	100,0ml

3.1.3.3. Meio Líquido (M-3) Ref. SHAMALA & SREEKANTIAH (1986)

Farelo de trigo	1,00g
Caseína	0,75g
KH ₂ PO ₄	1,50g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,40g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,03g
Urea	0,03g
Solução de sais minerais ..	0,10ml
Carbono*	2,50g
Água destilada qsp	100,00ml
pH 5.5	

* celulose ou xilano

Solução de Sais Minerais (B)

FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00mg
MnSO ₄ .7H ₂ O	1,60mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,34mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,00mg
Água destilada qsp .	1000,00ml

3.1.3.4. Meio Líquido (M-4) Ref. MURAD et alii (1979)

NaNO ₃	1,0g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
Carbono*	1,0g
Extrato de farelo de trigo** qsp.	100,0ml
pH 5,6	

* xilano ou celulose

** O extrato de farelo de trigo foi preparado dissolvendo-se 10g de farelo de trigo em 100ml de H₂O destilada. Aqueceu-se a mistura a 120°C por 10 minutos e após, fez a filtração com papel de filtro Whatman nº1 à pressão atmosférica.

3.1.3.5. Meio Líquido (M-5) Ref. WOJTCZAK et alii (1987)

Peptona 0,10g
Extrato de levedura 0,20g
MgSO₄.7H₂O 0,02g
Carbono* 2,00g
CaCl₂.2H₂O 0,01g
Água destilada qsp 100,00ml
pH 6.5

* xilano ou celulose

3.1.3.6. Leowian's Agar

Maltose 0,60g
Extrato de malte 0,60g
Extrato de levedura 0,30g
KH₂PO₄ 0,12g
Peptona 0,10g
MgSO₄.7H₂O 0,06g
Agar 2,00g
Água destilada qsp 100,00ml
pH 6,5

3.1.3.7. PDA (Batata Dextrose Agar) - Biobras, preparado conforme recomendação do fabricante.

3.1.3.8. Czapek's Agar - Difco, preparado conforme recomendação do fabricante.

3.1.3.9. Corn Meal Agar - Difco, preparado conforme recomendação do fabricante.

3.1.3.10. Malt Extract Agar - Difco, preparado conforme recomendação do fabricante.

3.1.4. MICRORGANISMO

O microrganismo usado na realização deste trabalho foi obtido por seleção natural no laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA, onde também foi classificado como uma linhagem termófila do fungo Humicola sp 179-5 conforme método de seleção e classificação descritos posteriormente no item 3.2.1 da seção de métodos. A cultura foi mantida em tubos de FDA inclinado a 5°C com repiques de 15 em 15 dias.

3.2. METODOS

3.2.1. SELEÇÃO E ISOLAMENTO DO MICROGANISMO TERMOFILO

3.2.1.1. Pré-Seleção dos Microrganismos

A escolha do microrganismo para a realização deste trabalho ocorreu por seleção natural no laboratório a partir de coletas no campo de amostras de solos, resíduos agrícolas, compostagens, madeiras deterioradas, etc. As amostras foram originadas de diferentes regiões do Brasil como São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso e Amazonas. As amostras (0,5 a 1,0 g) foram inoculadas em tubos contendo 10 ml de meio de enriquecimento de MANDELS e STERNBERG (1976), onde a fonte de carbono era papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm por 10 cm). e incubados a 50°C por 10 dias. Os tubos onde ocorreu degradação da parte submersa das fitas de papel de filtro, foram recolhidos e os meios de cultura, após diluição adequada em água destilada e esterilizada, foram inoculados por superfície em placas de Agar-Dextrose-batata (PDA) estéril e incubadas a 50°C por até uma semana. As colônias que desenvolveram foram transferidas para tubos de PDA inclinado esteril.

3.2.1.2. Seleção do Microrganismo

As linhagens pré-selecionadas e isoladas foram inoculadas em frascos de 125ml contendo 20 ml do meio de MANDELS & STERNBERG (1976), suplementado com 1% de xilano em pó e incubados a 50°C com agitação a 120 rpm por 5 dias. Após a incubação o meio de crescimento foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o so-

brenadante foi utilizado para medir a atividade extracelular de xilanase, CMCase, Avicelase e β -glicosidase. Por outro lado, também foi testada a atividade enzimática nos extratos do cultivo em meio sólido dos fungos que não cresceram bem no referido meio líquido.

3.2.2. PRODUÇÃO DE ENZIMA POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

A produção de enzima por fermentação sólida foi realizada usando a linhagem do microrganismo isolado que produziu maior atividade de xilanase.

O meio sólido foi preparado e inoculado como descrito no item 3.1.3.1. e após o período de incubação, 100ml de água destilada foram adicionadas aos frascos para extração da enzima durante 1 a 2 horas seguido de filtração sob pressão atmosférica em papel de filtro Whatman nº 1. A cultura filtrada foi usada como extrato livre de células.

3.2.3. PRODUÇÃO DA ENZIMA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A linhagem selecionada foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml dos meios de cultura líquidos, como descrito nos itens 3.1.3.2. a 3.1.3.5. Os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 50°C por até 10 dias. Após o período de incubação os meios foram filtrados em papel de filtro sob pressão negativa utilizando bomba de vácuo. O micélio foi lavado com 3 volumes de água destilada e colocado para secar em estufa a 105°C

até estabilização do peso para determinação do peso seco. O filtrado foi usado como extrato livre de células.

3.2.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A dosagem dos açúcares redutores foi realizada pelo método do DNS (3,5-Ácido dinitrosalicílico) como proposto por MILLER (1959).

3.2.5. PRINCÍPIOS DA AÇÃO ENZIMÁTICA.

As enzimas Avicelase, CMCase e Endoxilanase atuam sobre seus respectivos substratos avicel, CMC e xilano, hidrolisando os e conseqüentemente liberando substâncias redutoras. As reações podem ser monitoradas por ensaios de quantificação de açúcares redutores ou viscosimetricamente pela redução no comprimento das moléculas do substrato. Neste trabalho empregou-se o método de MILLER (1959) de dosagem de açúcares redutores.

As enzimas β -glicosidase, β -xilosidase e arabinofuranosidase atuam sobre seus respectivos substratos sintéticos P-nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNFG), P-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (PNPX) e P-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (PNPA), liberando para-nitrofenol como um dos produtos da reação. O nitrofenol produz uma cor amarela intensa em solução alcalina acima de pH 8,0 e pode ser quantitativamente medido a 420nm.

3.2.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.2.6.1. Atividade de Xilanase

A mistura da reação foi composta por 0,1ml da enzima, convenientemente diluída, mais 0,9ml de uma solução 1% de xilano (Larchwood xylan, Sigma Co.) em tampão acetato 0,1M e pH 5,0. A solução do substrato foi pré-incubada a 60°C por 5 minutos para equilibrar a temperatura e a solução enzimática adicionada no momento exato que se iniciava a contagem de tempo. Ao final de 10 minutos com agitação, a reação foi interrompida pela adição de 1ml da solução de DNS. A substância redutora formada foi determinada, a partir de curva padrão de xilose.

3.2.6.2. Atividade de CMCase

A atividade de CMCase foi determinada por procedimento idêntico ao de atividade de xilanase, exceto que o substrato utilizado foi carboximetilcelulose (CMC), Hércules, tipo 7H35F.

3.2.6.3. Atividade de Avicelase

A atividade de avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao de atividade de xilanase, exceto que o substrato utilizado foi avicel (Sigma Co.).

3.2.6.4. Atividade de β -xilosidase

A mistura de reação foi composta de 0,1ml da enzima, convenientemente diluída, mais 0,9ml de uma solução 1mM de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (Sigma Co.) em tampão acetato de sódio 0,1M e pH 5.0. A solução do substrato era incubada a 60°C por 5 minutos para equilibrar a temperatura e a solução enzimática adicionada no momento exato que se iniciava a contagem do tempo de reação. Ao final de 10 minutos a reação era interrompida pela adição de 6ml de solução de NaOH 0,1M. O p-nitrofenol liberado foi determinado espectrofotometricamente em 420 nm. A atividade enzimática foi determinada a partir de curva padrão de p-nitrofenol (Sigma Co.).

3.2.6.5. Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada por procedimento idêntico ao de atividade de β -xilosidase, exceto que o substrato utilizado foi p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma Co.).

3.2.6.6. Atividade de α -glicosidase

A atividade de α -glicosidase foi determinado por procedimento idêntico ao da atividade de β -xilosidase, exceto que o substrato utilizado foi p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Koch - Light Lab.)

3.2.6.7. Atividade de Arabinofuranosidase

A atividade de arabinofuranosidase foi determinada por procedimento idêntico ao de atividade β -xilosidase, exceto que o substrato utilizado foi p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (Sigma Co).

3.2.7. UNIDADE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Uma unidade da respectiva atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de xilose ou glicose ou p-nitrofenol por minuto sob as condições padronizadas.

3.2.8. CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA BRUTA

Após obtenção do extrato livre de células, o mesmo foi resfriado em banho de gelo. Em seguida adicionou-se etanol (-18°C) até 70% de saturação (v/v) e a mistura foi deixada em repouso por uma noite a 5°C . O precipitado foi obtido, primeiramente por sifonação da maior parte do sobrenadante límpido e depois por centrifugação refrigerada (5°C) a 6.000rpm por 5 minutos. O precipitado úmido total foi espalhado sobre uma placa de vidro e deixado secar sob ventilação em sala climatizada a 21°C . O precipitado seco foi coletado e transferido para almofariz onde foi totalmente moído até obtenção de um pó fino, o qual foi usado para estudos da enzima bruta.

3.2.9. PURIFICAÇÃO DO SISTEMA DE XILANASES

3.2.9.1. Produção da Enzima

A enzima foi obtida de um caldo de fermentação em meio sólido de farelo de trigo. O processo de obtenção deste caldo foi iniciado inoculando-se os esporos do Humicola sp 179-5 em 20 frascos Erlenmeyers de 500 ml contendo 20 g do meio sólido. Os frascos foram incubados a 50°C durante 4 dias e em seguida a enzima foi extraída com 100 ml de água destilada por frasco, durante uma hora intercalando-se períodos de repouso e agitação suave. O material insolúvel foi separado por filtração em papel de filtro e o filtrado livre de células foi usado no processo de purificação.

3.2.9.2. Precipitação com Etanol

Os meios de cultura filtrados foram reunidos num único recipiente dando um volume de 1.500 ml, que foi resfriado em banho de gelo até 4°C e, em seguida foi adicionado álcool etílico P.A. (-18°C) até 70% V/V. Esta mistura permaneceu em repouso durante a noite em banho de gelo que foi acondicionado em geladeira.

O precipitado formado foi separado por centrifugação e liofilizado. O precipitado alcóolico seco foi, então, triturado obtendo-se ao final, um pó fino, que foi empregado nas etapas de purificação subsequentes.

Vários procedimentos tentativos de purificação foram testados por nós. Finalmente um processo apresentou bom resultado e foi usado com sucesso na purificação das xilanases.

3.2.9.3. Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50

Dois gramas do precipitado obtido no sub-item anterior, foram dissolvidas em 20 ml do tampão acetato 0,5M pH 5,0 e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. 15 ml desta solução, foram submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna contendo a resina de DEAE-sephadex A-50 (2,0 x 56 cm) equilibrada com tampão acetato 0,05 M pH 5,0. A coluna foi primeiramente eluída somente com o tampão (350 ml) e depois com o tampão e solução salina 1 M. O sistema foi montado para promover um gradiente linear crescente de concentração salina na solução do tampão de eluição da coluna. Esta operação tinha a finalidade de eluir primeiramente as proteínas não absorvidas (com cargas elétricas negativas iguais à resina), e após o gradiente de concentração salina, promover a eluição das proteínas absorvidas de cargas elétricas contrárias à resina) (SCOPES, 1988). Frações de 5,5 ml foram coletadas por tubo (coletor Buchler modelo Alpha 200). O fluxo foi de 5,5 ml/30 minutos.

O perfil de eluição de proteínas foi acompanhado a 280nm em um aparelho espectrofotômetro, Perkin-Elmer de duplo feixe.

A atividade de xilanase foi medida nas frações eluídas e, de acordo com os picos de atividades, cada conjunto de frações foi juntado e dializado contra água destilada e aplicado à coluna de CM-Sephadex.

3.2.9.4. Cromatografia em CM-Sephadex C-50

Após a eluição em DEAE-Sephadex A-50, cada conjunto de frações juntadas foram dializadas e aplicadas à coluna de CM-Sephadex C-50. A coluna foi tratada, equilibrada e eluída de forma idêntica ao procedimento descrito para a coluna de DEAE-Sephadex A-50 (item 3.2.9.3).

3.2.10. ANÁLISE DO PADRÃO DE AÇÃO ENZIMÁTICA

Dois tipos de xilanos foram usados para este ensaio, xilano Larchwood e xilano Oat Spelt (arabinoxilano), ambos da marca Sigma. O xilano Larchwood foi purificado até obter xilano puro, sem ramificações laterais e com apenas ligações β -1,4 como descrito por TAIZ & HONIGMAN (1976). O xilano Oat Spelt não foi purificado.

As frações obtidas após a purificação foram analisadas quanto ao tipo de ação hidrolítica (exo ou endo) a partir de uma mistura de reação constituída de 0,9 ml de solução 1% de xilano (purificado ou não) em tampão acetato 0,1M pH 5,0 e 0,1 ml da xilanase (0,5 U/ml). A mistura foi incubada a 60°C por 1 hora sob agitação, em seguida inativou-se a enzima por aquecimento a 100°C por 10 minutos. Os hidrolisados foram analisados por cromatografia em papel descendente e por HPLC. Amostras autênticas de D-xilose, xilobiose, L-arabinose e glicose foram obtidas de Sigma Co. e xilotriose e xilotetraose foram preparadas como descrito por LEE et alii (1987).

3.2.10.1. Cromatografia em papel

Os produtos da hidrólise foram analisados pelo método de cromatografia descendente, baseado no procedimento de TREVELYAN et alii (1950), usando acetato de etila-isopropanol-água (6:3:1:) como sistema de solvente de corrida e nitrato de prata-NaOH alcoólico para revelação das manchas.

3.2.10.2. HPLC

Os produtos de hidrólise, também foram identificados por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão). 10 μ l das amostras hidrolisadas foram aplicadas ao cromatógrafo Waters, composto de bomba modelo 6000 A, injetor U6K, detector de índice de refração R-401, integrador HPX 87P de 7,8 x 300mm (Birad). As amostras foram eluídas com água a 85°C e vazão de 1ml/min. As amostras foram identificadas, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de xilose, xilobiase, xilotriose e arabinose.

3.2.11. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

Após a purificação cada uma das enzimas teve seu peso molecular determinado por dois métodos:

3.2.11.1. Cromatografia em Coluna de Sephadex G-200

A filtração em coluna de gel de Sephadex G200 (Pharmacia Fine Chemicals Inc.), foi realizada conforme metodologia de ANDREWS (1965). Foram utilizados como padrões albumina de soro bovi-

no (PM 67.000 Da), albumina do ovo (PM 43.000 Da) e Lisozima (PM 14.000 Da). A coluna (2,0 x 100 cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,05M e pH 7,5. As enzimas purificadas e liofilizadas foram dissolvidas em pequeno volume do tampão de eluição e aplicadas à coluna. O fluxo foi regulado para 16 ml/h. O coletor foi ajustado para mudar os tubos a cada 15 minutos. O volume do eluente por tubo foi de 4 ml. Dextrana azul 2.000 foi usada para determinar o volume morto.

3.2.11.2. Eletroforese SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de sódio (SDS - PAGE, Pharmacia Fine Chemicals Inc.), foi realizada conforme método de WEBER & OSBORN (1969) e procedimento delineado por GUERRA & PARK (1973), usando kit de calibração para eletroforese para determinação de peso molecular da Pharmacia LKB.

3.2.11.2.1. Preparo das amostras de proteínas para eletroforese

As xilanases (X-I, X-II e X-III) eluídas da coluna de CM-Sephadex C-50 foram dialisadas contra água destilada durante 12 horas à 4°C. Após diálise, as amostras foram liofilizadas. As amostras liofilizadas, bem como a mistura de proteínas padrões foram incubadas à 100°C por 5 minutos em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo 2,5% SDS e 5% de β -mercaptoetanol.

3.2.11.2.2. Proteínas Padrão (Pharmacia) usadas na Eletroforese

	P.M. (Da)
Fosforilase B	94.000
Albumina de soro bovino	67.000
Ovoalbumina	43.000
Anidrase carbônica	30.000
Inibidor de tripsina	20.100
α -lactoalbumina	14.400

3.2.11.2.3. Preparo do Gel e desenvolvimento da eletroforese

Para obter gel de poliacrilamida 10%, 22,2g de acrilamida e 0,6g de metilenobisacrilamida foram dissolvidas em água para dar 100ml. O tampão do gel consistiu de 7,8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38,6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2g de SDS em 1.000ml de água. 15 ml do tampão do gel foram misturados com 13,5 ml da solução de acrilamida, 1,5 ml de solução de persulfato (15 mg/ml) e 0,045 ml de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino, e imediatamente foi colocado na placa do gel. Antes que o gel endurecesse, uma gota de água foi espalhada no topo da solução. Após a polimerização do gel, a água foi succionada e 10 μ l das amostras de proteínas foram aplicadas ao gel. O tampão do gel foi diluído 1:1 com água e usado para encher os dois compartimentos do aparelho de eletroforese. A eletroforese se desenvolveu sob corrente constante de 3 ma/tubo por 12 horas. Após a corrida, o gel foi removido da placa e o seu comprimento e a distância percorrida pelo corante foram medidas. O gel foi fixado em TCA 50% durante a noite e corado por 2 horas em azul de Coomassie

0,25% em TCA 20% e descorado com ácido acético-metanol-água (1:3:6 v/v/v). A mobilidade da proteína foi determinada pela fórmula:

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{Distância de migração da proteína} \times \text{comprimento antes de corar}}{\text{comprimento do gel após descoramento} \times \text{distância de migração do corante}}$$

As mobilidades foram plotadas contra os pesos moleculares das proteínas padrões expressos em escala logaritmica.

3.2.12. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de LOWRY et al (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.2.13. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ENZIMAS

3.2.13.1. Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima obtida em soluções tampão de diferentes valores de pH (2,0 a 10,0) contendo o seu respectivo substrato.

Os ensaios de atividade foram realizados a 60°C por 10 minutos, e prosseguiu conforme condições definidas anteriormente, a partir do item 3.2.6.

3.2.13.2. Efeito da Temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre as atividade enzimática foi determinado incubando-se a enzima em soluções de seus respectivos substratos, preparados em tampão acetato 0,1M pH 5,0, em diferentes temperaturas por 10 minutos, conforme condições de ensaios enzimáticos definidas anteriormente a partir do item 3.2.6.

3.2.13.3. Efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática

O efeito do pH sobre a enzima foi determinado incubando-se a enzima, sem o seu substrato, em soluções a diferentes valores de pH. O tratamento foi de 24 horas à temperatura ambiente. A atividade enzimática residual, após o tratamento, foi medida incubando-se a enzima tratada em solução tampão acetato 0,1M e pH 5,0 contendo o seu respectivo substrato. A atividade foi determinada a 60°C por 10 minutos, conforme condições definidas anteriormente a partir do item 3.2.6.

3.2.13.4. Efeito da Temperatura na estabilidade da atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a enzima, foi determinado dissolvendo-se a enzima, sem o seu substrato, em solução tampão acetato 0,1M pH 5,0 e incubando-se a várias temperaturas. Após 60 minutos de incubação a atividade residual foi medida incubando-se a enzima tratada, em solução tampão acetato 0,1M pH 5,0 conforme condições definidas anteriormente a partir do item 3.2.6.

3.2.14. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE HIDROLISE DOS SUBSTRATOS CELULOSICOS E HEMICELULOSICOS

A mistura de reação contendo 1g do substrato (xilano Larchwood ou arabinoxilano ou CMC) em 90 ml do tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 10ml da solução enzimática (0,5 U/ml) foi incubada a várias temperaturas. Em intervalos de tempos definidos foram retiradas aliquotas e o aumento dos grupos redutores produzidos foi determinado pelo método de DNS. A taxa de hidrólise (%) foi calculada a partir da relação entre a quantidade de grupos redutores produzidos com a enzima, e a quantidade de grupos redutores produzidos após hidrólise ácida. Nas condições do presente trabalho (H_2SO_4 1N e ebulição por 30 minutos) a hidrólise ácida dos substratos foi total (100%).

3.2.15. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE IONS METALICOS E SUBSTANCIAS QUIMICAS SOBRE A ATIVIDADE DAS XILANASES

O efeito de íons, na forma de sais, sobre a atividade das xilanases purificadas foi estudado juntando-se os sais à solução de substrato de forma que a mistura final de reação apresentasse a seguinte proporção de reagentes: 0,9ml de substrato 1%, sais 1×10^{-3} M e 0,1ml de enzima (0,5 U). O inibidor iodoacetamida foi usado de forma idêntica. As misturas foram incubadas por 10 minutos a $60^{\circ}C$ e as atividades determinadas conforme descrito no item 3.2.6. As atividades foram comparadas ao controle, cuja atividade foi medida na ausência de sais ou inibidores e os resultados expressos em porcentagem de atividade relativa.

Os seguintes sais foram usados: CaCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 , KCl , BaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, EDTA e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

3.2.16. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA POLPA DE EUCALIPTO.

A polpa de eucalipto obtida por processo Kraft, foi preparada para fabricação de papel pela Champion paper e cellulose Ltd. Mogi-Guaçu, SP. Suspensões a 1,5% (base seca) desta polpa em tampão acetato pH 5,0, foram tratadas com soluções contendo 5 unidades de atividade enzimática (precipitado etanólico, xilanase I, xilanase II e xilanase III) e incubadas a 50°C por 15 horas sem agitação. A polpa foi separada do sobrenadante e lavada com água destilada por filtração em papel de filtro Whatman no 1. Os produtos solúveis no sobrenadante foram determinados por cromatografia em papel. A viscosidade das polpas tratadas enzimaticamente foi avaliada determinando-se a viscosidade de soluções de polpa a 0,5% usando-se etilenodiaminocáprico 0,5M como solvente, como descrito em TAPP (Technical Association of Pulp and Pulp Industry) T-230 OM-82. A alvura das polpas tratadas enzimaticamente foi medida por refração direcional a 457 nm como descrito em TAPP T-452 OM-87.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO

A linhagem do microrganismo termófilo utilizado na realização deste trabalho foi isolado a partir de 447 amostras de materiais coletados no campo. As amostras foram incubadas no meio de seleção e aquelas que degradaram a parte submersa do papel de filtro após incubação de 10 dias a 50°C foram plaqueadas e incubadas a 50°C. Por este método 179 linhagens de fungos e 280 linhagens de bactérias foram isoladas e testadas conforme procedimento do item 3.2.1.

Uma linhagem de fungo termófilo com excepcional atividade xilanolítica foi isolada a partir de madeira deteriorada originada de Manaus - AM.

4.2. IDENTIFICAÇÃO

A linhagem do fungo termófilo isolado apresentou as seguintes características morfológicas:

Hifas brancas (hialina), septadas com 1 a 4 μ m de diâmetro. Aleuriosporos lisos e brancos no início do crescimento, tornando-se levemente marrons no fim (6 a 7 dias), normalmente de forma elipsoidal, principalmente quando desenvolvidos nas extremidades das hifas e às vezes redondos, principalmente quando desenvolvidos nas ramificações laterais. Os esporos apresentaram diferenciação unitária ou múltipla intercalada.

A presença de fialósporos não foi detectada. A linhagem cresceu muito bem a 50°C em PDA e a faixa de temperatura de crescimento foi de 30 a 60°C. Segundo as características acima a linhagem do fungo isolado foi classificada como Humicola sp 179-5 de acordo com as descrições do manual para fungos termófilos de COONEY & EMERSON (1964), figura 5. As diferenças de cor e formato dos esporos nos diferentes meios testados (itens 3.1.3.6 a 3.1.3.10), foram inconsistentes com as descrições das espécies de Humicolas descritas no manual, ou seja, H. isolens, H. grisea, H. stellata, H. lanuginosa.

4.3. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELA LINHAGEM DO Humicola sp. 179-5

4.3.1. EFEITO DA TEMPERATURA DE CULTIVO SOBRE PRODUÇÃO DE XILANASE

A linhagem de Humicola sp 179-5, produziu xilanase mais eficientemente a 50°C, como mostra a figura 6. A cultura foi inoculada em frascos contendo o meio sólido de farelo de trigo e estes incubados a temperaturas variando de 30 até 65°C, por 4 dias. A atividade foi medida no filtrado após extração com água. Resultado semelhante para a enzima CMCase foi relatado por HAYASHIDA e YOSHIOKA (1980) em fungo H. isolens YH-88 e YOSHIOKA et alii (1982) em fungo H. grisea var. thermoidea YH-78.

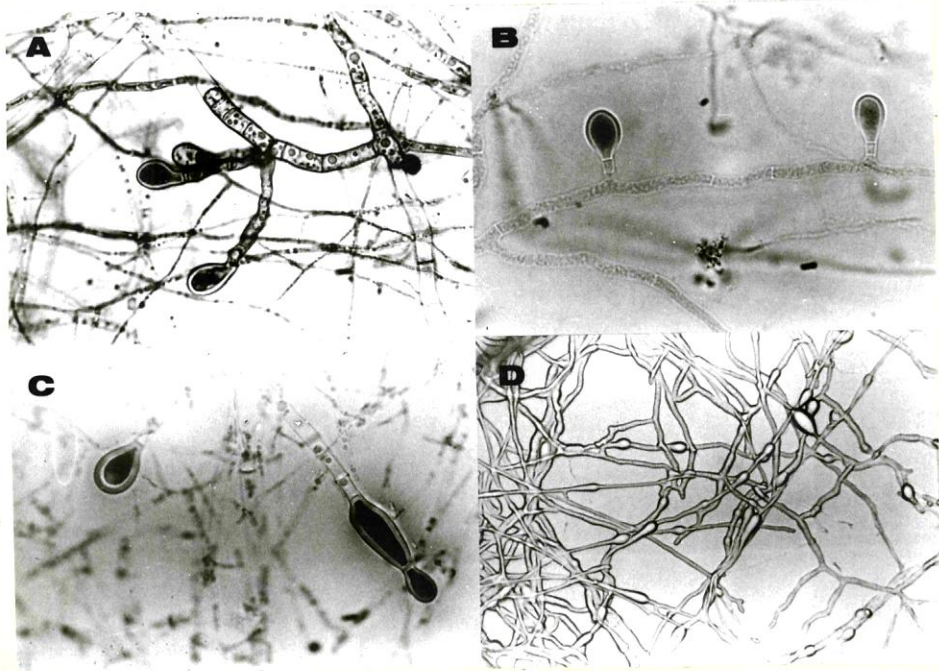


Figura 5: Fotomicrografias da linhagem de Humicola sp 179-5.

A, B e C com aumento de 1.250 X e D com aumento de 500 X.

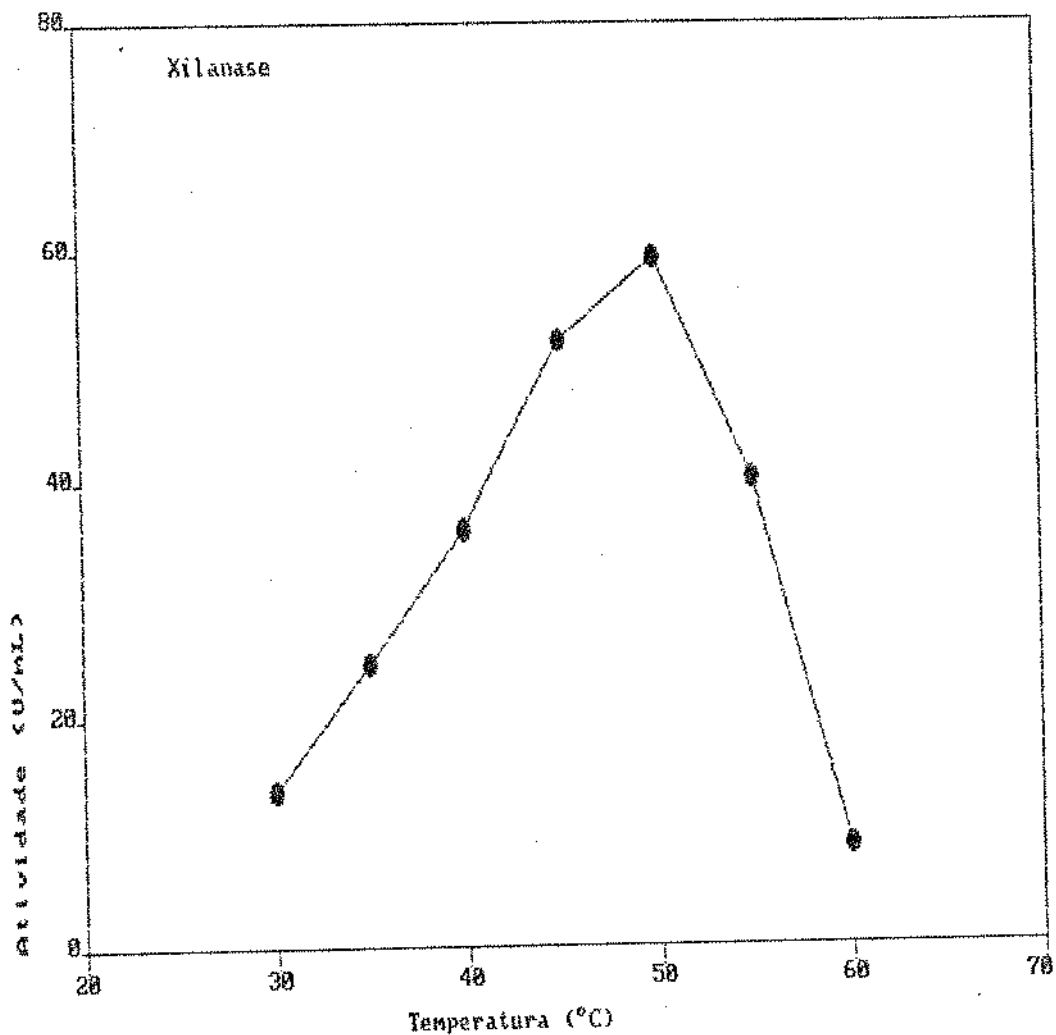


Figura 6: Efeito da temperatura de crescimento do *Humicola* sp 179-5 na produção de xilanase.

O microrganismo cresceu em meio sólido por 4 dias e atividade de xilanase foi determinada no extrato enzimático livre de células.

4.3.2. EFEITO DO TIPO DE MEIO DE CULTURA SOBRE AS DIVERSAS ATIVIDADES ENZIMATICAS

A produção de enzimas fúngicas é realizada pelo cultivo superficial em meio sólido ou submerso em meio líquido, buscando um melhor rendimento enzimático. Algumas vezes o resultado é melhor quando se emprega o meio líquido, principalmente porque facilita o processo de purificação (MURAO et alii, 1979). A escolha do tipo de fermentação, se sólida ou submersa, depende muito da adaptação do microrganismo, por ex. *T. reesei* é fermentado quase que exclusivamente em cultura submersa com solução de sais inorgânicos incluindo uma fonte de nitrogênio e carbono (MANDELS, 1982).

Por outro lado, nos processos de bioconversão, a produção de enzimas é uma das partes mais onerosas e seu custo pode ser consideravelmente reduzido usando substratos de baixo custo como farelo de trigo e casca de arroz em meio sólido (SHAMALA e SREEKANTIAH, 1987), além disso a técnica é simples e ajuda a obter uma solução concentrada de enzimas (SHAMALA & SREEKANTIAH, 1986). O fungo *Humicola* se adapta muito bem ao meio sólido conforme os resultados obtidos e compara-se àqueles descritos por HAYASHIDA & YOSHIOKA (1980) e YOSHIOKA et alii (1982). Assim, o crescimento do organismo, bem como sua produção enzimática foram comparados, usando-se meios líquidos e o meio sólido, preparados como descritos no item 3.1.3..

A tabela 2 mostra os resultados encontrados. A fonte de carbono usada nos meios líquidos foi xilano (celulose também foi testada e o resultado foi semelhante). Uma comparação entre os re-

sultados mostra claramente a superioridade de crescimento e produção enzimática que ocorreu no meio sólido em relação aos 4 outros meios líquidos empregados.

Meios	Avicelase U/ml	CMAse U/ml	β -Glicosidase U/ml	Xilanase U/ml
M-1	1,40	30	1,0	64
M-2	N.D.	1,50	0,14	2,60
M-3	1,40	2,00	0,04	1,18
M-4	1,70	0,97	0,03	N.D.
M-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tabela 2: Atividade dos cultivos em meios sólido e líquidos.

M-1, 4 dias de incubação*

M-2, 8 dias de incubação*

M-3, M-4 e M-5, 7 dias de incubação*

M-1, meio sólido; M-2, M-3, M-4 e M-5, meios líquidos de composições diferentes.

N.D., não detectado

* Período onde a produção enzimática foi máxima

4.3.3. CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Afim de estabelecer as condições ideais para produção de enzima, foi determinado o tempo de fermentação para a atividade enzimática máxima. O experimento foi realizado empregando o meio sólido (M-1) e o meio líquido (M-2) usando xilano como fonte de carbono.

4.3.3.1. Meio sólido

Como pode ser observado pela figura 7, o fungo produziu uma excepcional atividade de xilanase. A produção máxima de xilanase, CMCase e avicelase ocorreu no 4º dia. Para a xilanase, a produção máxima se estendeu até o 6º dia, quando então, começou a declinar. A produção de CMCase manteve-se máxima até o 5º dia, enquanto a avicelase teve um pico máximo no 4º dia. A produção de β -glicosidase, entretanto, só alcançou o pico máximo no 5º dia de incubação. A variação de pH também foi acompanhada e seu perfil mostrou um aumento, de 5,0 para 7,0 do primeiro ao 4º dia, quando se estabilizou até o 7º dia e começou a declinar novamente.

4.3.3.2. Meio líquido

Conforme foi observado anteriormente, os meios líquidos utilizados não são adequados para produção enzimática do Humicola sp 179-5. Observando a figura 8, pode-se verificar que até o 4º dia de incubação (50°C e 120rpm) o crescimento celular (peso seco do micélio) foi desprezível e a produção de enzimas foi irrisória. A partir do 4º dia começou-se a detectar crescimento celular bem como atividade enzimática. A atividade enzimática de xilanase e CMCase atingiram o máximo no 8º dia de fermentação e no 9º dia já estava declinando. A atividade de avicelase foi detectada apenas a partir do 8º dia e foi máxima no 9º dia.

Comparando-se resultados do experimento em meio líquido com os do experimento em meio sólido, verificou-se a superioridade do meio sólido em relação ao meio líquido. Alguns traba-

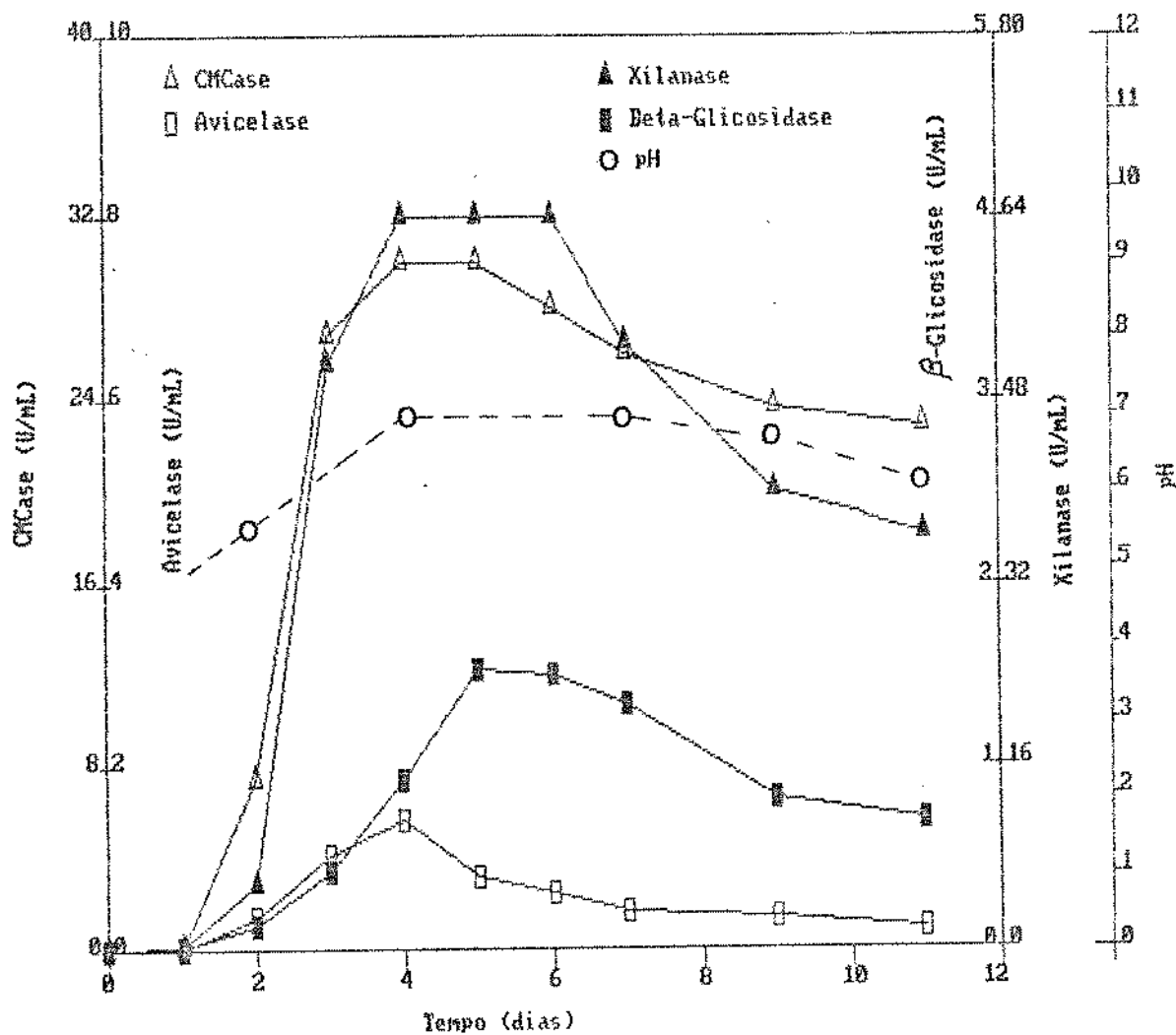


Figura 7: Produção enzimática do *Humicola* sp 179-5 no processo fermentativo em meio sólido.

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyers contendo o meio sólido de farelo de trigo incubados a 50°C

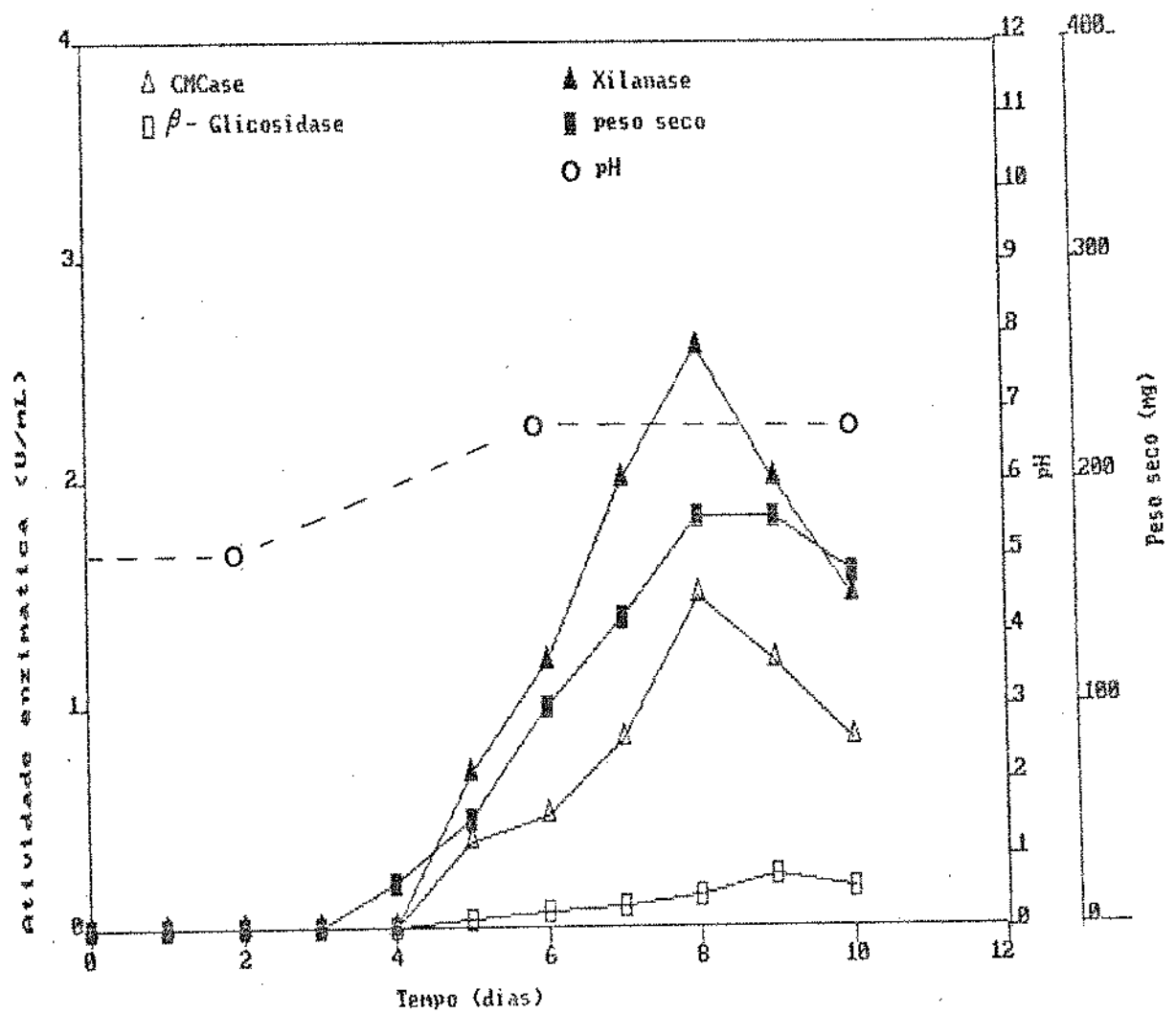


Figura 8: Produção enzimática do *Humicola* sp 179-5 no processo fermentativo submerso.

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyers contendo 50 ml do meio líquido M-2, suplementados com xilano e incubados a 50°C sob agitação de 120 rpm.

lhos (YOSHIOKA et alii, 1982; HAYASHIDA & YOSHIOKA, 1980; YOSHIOKA et alii, 1981) haviam relatado o uso de meio sólido para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, entretanto, nestes trabalhos as linhagens utilizadas necessitavam de fonte de carbono adicional (xilano, celulose, etc.) ao farelo de trigo. A linhagem estudada não necessitou de indutor para a produção dessas enzimas.

4.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ENZIMA BRUTA

4.4.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS BRUTAS

O efeito do pH sobre as atividades enzimáticas no filtrado bruto, foi verificado incubando-se o extrato enzimático em soluções tampão de vários pHs contendo o substrato durante 10 minutos.

O procedimento utilizado foi descrito no item 3.2.13.1 de material e métodos. Os resultados estão apresentados na figura 9. A xilanase apresentou pH ótimo entre 5,0 e 5,6 sendo que sua atividade caiu para 50% quando o pH foi de 4,0 ou 6,8.

A literatura registra que xilanase bruta de P. funiculosum apresentou pH ótimo em 4,0 (MISHRA et alii, 1985), I. longibrachiatum apresentou atividade máxima entre pH de 4,8 a 5,8 (ROY & NAKAS, 1989). McCARTHY et alii (1985) estudaram a atividade xilanásica extracelular de quatro actinomicetos termófilos e relataram que todos apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 5,0 a

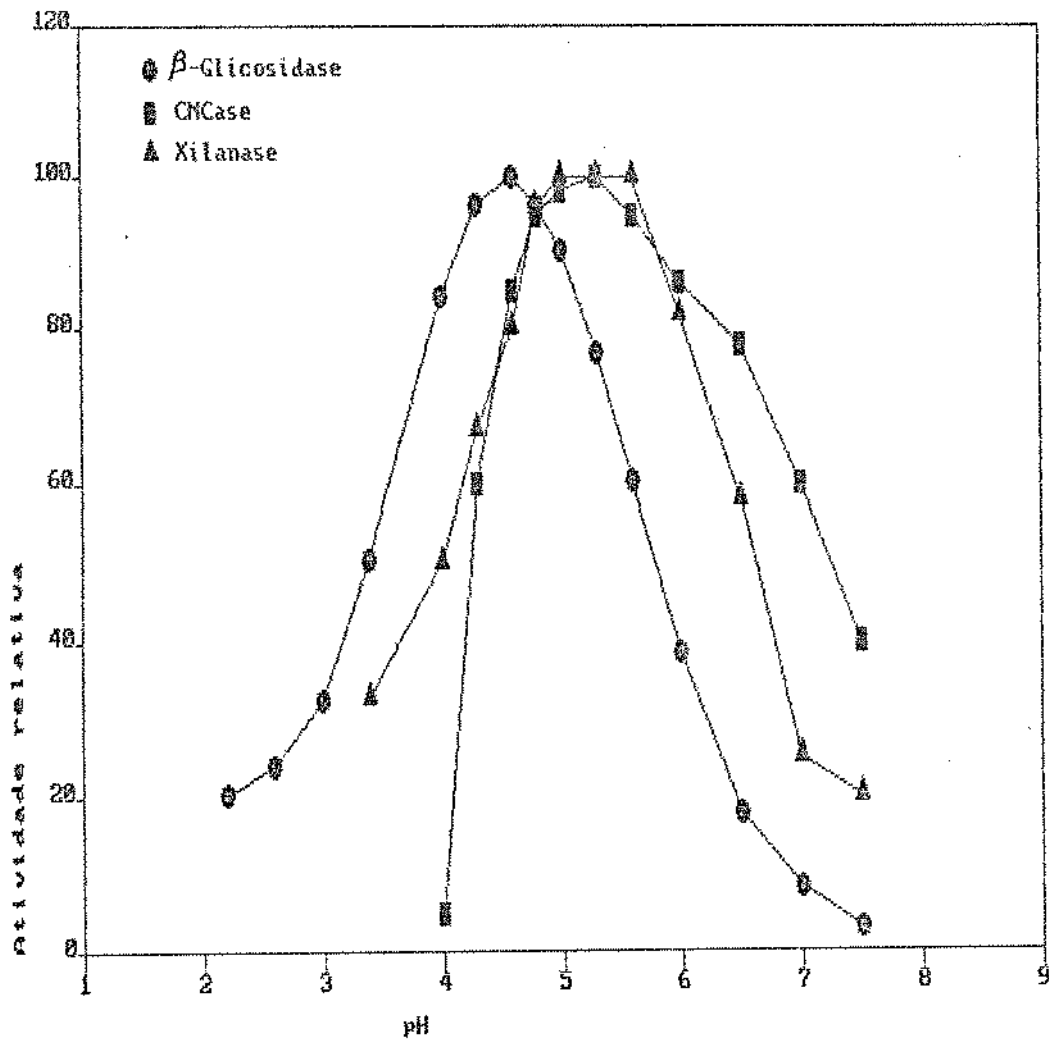


Figura 9: Efeito do pH sobre as atividades das enzimas brutas.

pH 3,0 - 5,6 tampão acetato

pH 5,6 - 8,0 tampão fosfato

As atividades foram determinadas nas diferentes soluções tampão contendo 1% dos respectivos substratos a 60°C por 10 minutos.

8,0. Assim nossos resultados estão de acordo com outros relatos publicados.

A figura 9, mostra ainda, que o pH ótimo para a atividade de CMCase bruta é 5,3. Entretanto em pH 4,0 a atividade foi quase completamente perdida e em pH 7,0 a enzima ainda reteve 58% da sua atividade. A maioria dos relatos sobre pH ótimo de CMCase bruta também estão próximos deste valor (MANDELS, 1982; DURAND et alii, 1984).

O efeito do pH sobre a atividade β -glicosidase bruta, apresentado na figura 9, mostra que a enzima é ativa apenas na faixa ácida de pH, ou seja de 2,5 a 7,0 com atividade máxima em pH 4,6. Em pH 3,0 apresentou cerca de 35% da atividade máxima e em pH 6,0 a atividade foi menor que 40%. Nossos resultados foram comparáveis a relatos sobre pH ótimo de β -glicosidase bruta (DURAND et alii 1984; MANDELS, 1982).

4.4.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS BRUTAS

A temperatura ótima de atividade enzimática bruta, foi determinada seguindo o procedimento descrito no item 3.2.13.2. Os resultados apresentados na figura 10, mostram que a temperatura ótima da xilanase bruta foi de 75°C. Comparando-se este valor com os relatos sobre atividade de xilanase bruta disponíveis na literatura, verifica-se que o fungo em estudo possui uma atividade xilanásica mais elevada que a de outros fungos: 70°C para I. terrestris, 70°C para S. cellulophilum, 55°C para I. reesei e 55°C para Penicillium sp (DURAND et alii, 1984). A temperatura ótima da en-

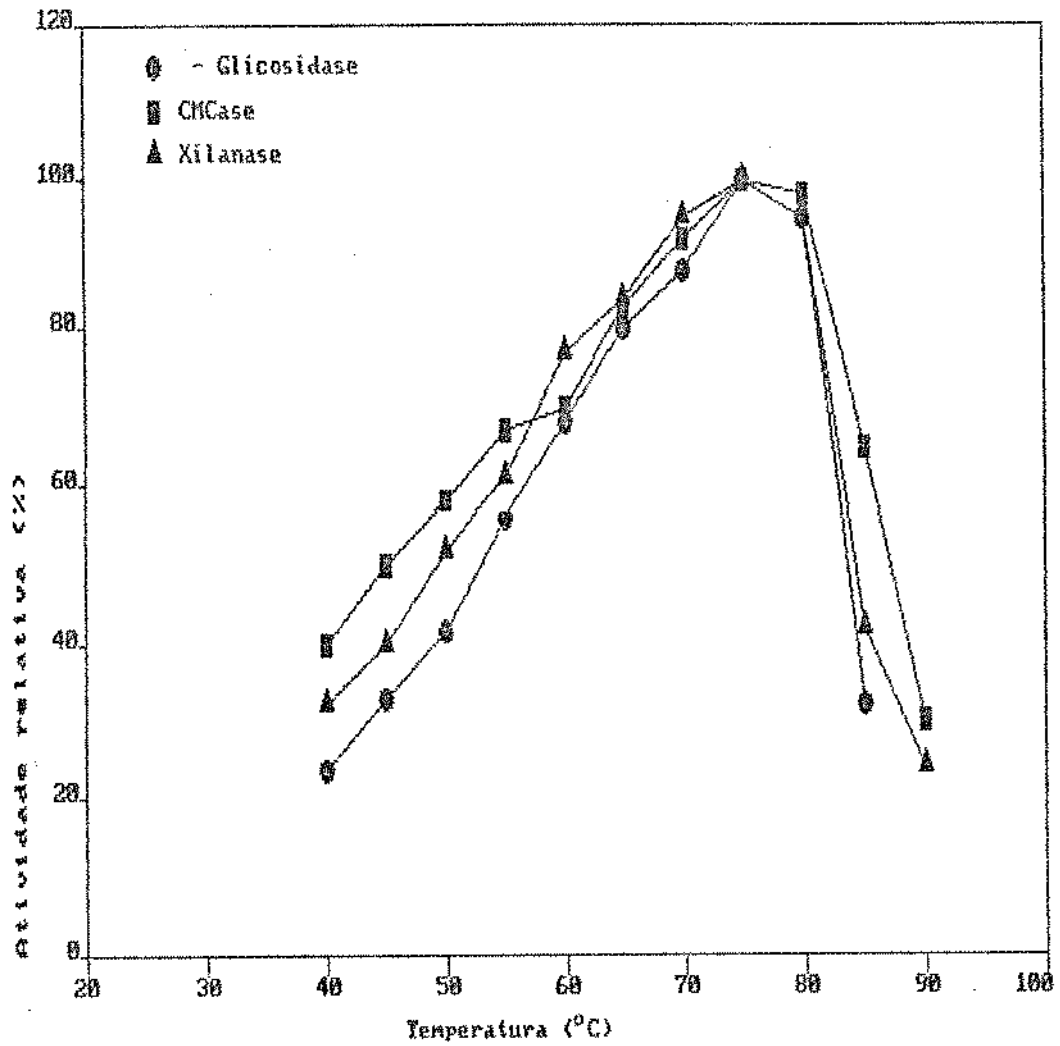


Figura 10: Efeito da temperatura nas atividades das enzimas brutas.

As atividades foram determinadas em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 contendo os respectivos substratos e incubados por 10 minutos em diferentes temperaturas.

zima de actinomicetos termófilos situa-se numa faixa de 60 a 80°C segundo relato de McCARTHY et alii (1985).

Os resultados apresentados na figura 10 mostram também que a atividade ótima da CMCase bruta foi 75°C nas condições padronizadas para o ensaio e a 85°C a enzima bruta ainda possuía 60% da atividade original.

Também, como pode-se observar na figura 10, a temperatura ótima da atividade de β -glicosidase bruta, foi 75°C. Os resultados estão dentro daqueles esperados para celulasas de organismos termófilos conforme a literatura disponível (MANDELS, 1982; DURAND et alii, 1984).

4.4.3. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS ENZIMAS BRUTAS

O pH de estabilidade da atividade enzimática bruta foi verificado seguindo o procedimento descrito no item 3.2.13.3. Os resultados apresentados na figura 11, mostram que a xilanase foi 100% estável numa ampla faixa de pH, ou seja de pH 3,5 a pH 8,0. Mesmo em pH 2,5 e pH 10,0 a enzima reteve 62% e 60%, respectivamente, da atividade máxima após o tratamento.

Os resultados obtidos com a CMCase bruta mostram que a enzima foi 100% estável numa ampla faixa de pH, desde 3,0 a 8,0. A enzima bruta reteve ainda 85% da atividade máxima em pH 2,0 e 90% da atividade após o tratamento em pH 9,0, mas em pH 10,0 apenas 25% da atividade foi recuperada.

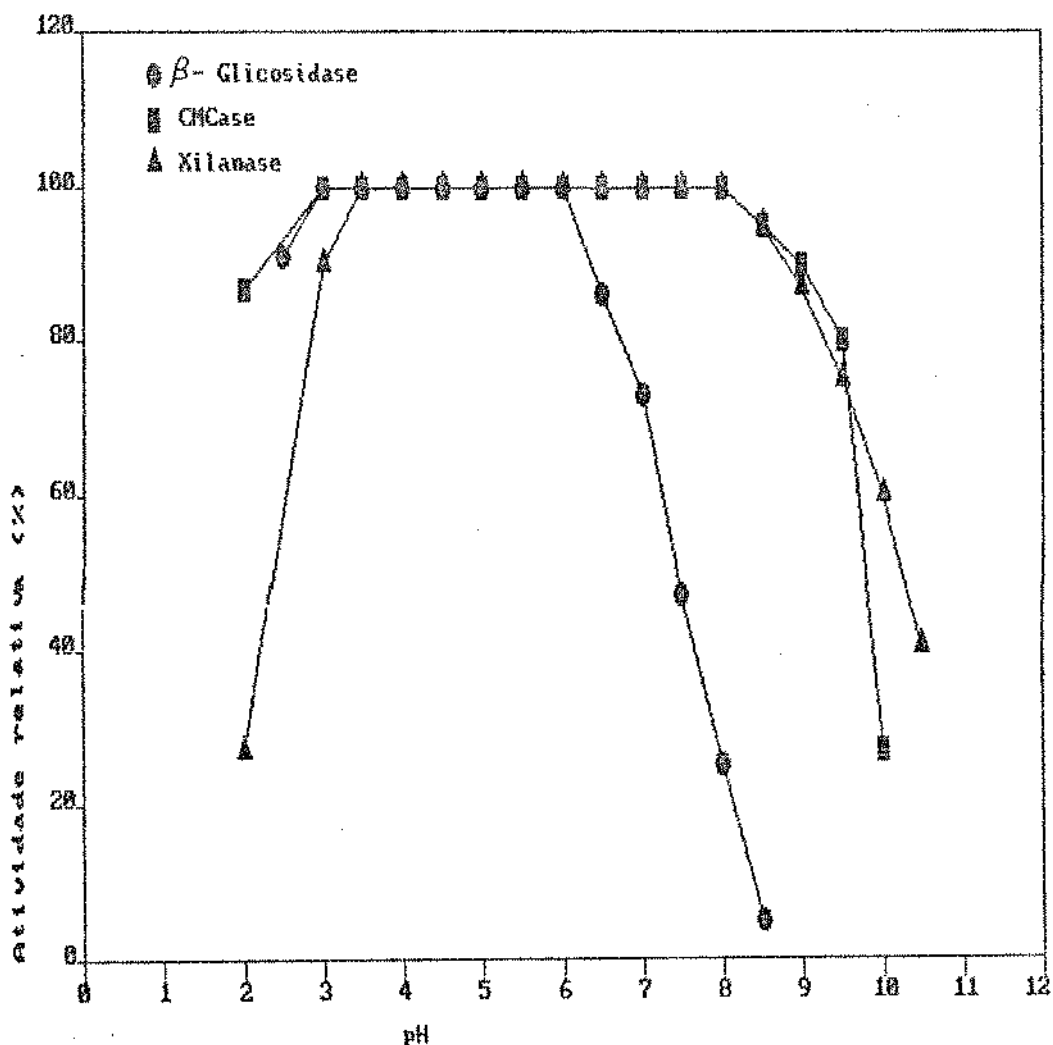


Figura 11: Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas brutas.

pH 2,2 - 8,0 tampão McIlvaine 0,1 M

pH 8,0 - 9,0 tampão Tris-HCl 0,1 M

pH 9,0 - 11,0 tampão Gly - NaOH 0,1 M

As enzimas brutas foram incubadas sem o substrato em tampão de diversos valores de pH por 24 horas à temperatura ambiente. A atividade residual foi determinada em solução dos respectivos substratos em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 a 60°C por 10 minutos.

Na mesma figura 11, observa-se que a β -glicosidase bruta mostrou-se estável apenas na faixa de pH ácido. Em pH 2,5 reteve 90% da atividade, entre pH 3,0 e pH 6,0 manteve 100% da atividade, mas em pH 7,0 já caiu para 72% e em pH 8,0 menos de 25% da atividade foi retida.

Os dados mostram que as enzimas xilanases e CMCases exibiram muito boa estabilidade ao pH sob as condições testadas, principalmente na faixa de pH entre 3,0 e 7,0 que são as condições mais frequentes na prática industrial. A β -glicosidase foi uma exceção, apresentando-se bastante instável abaixo de pH 3,0 ou acima de 6,0, entretanto de acordo com DURAND (1984) isto é comum para as β -glicosidases, pois a enzima de *T. reesei*, também foi muito instável em pH abaixo de 3,0 e acima de 7,0 (DURAND, 1984).

4.4.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS ENZIMAS BRUTAS

A estabilidade térmica das enzimas foi estudada seguindo-se o procedimento descrito no item 3.2.13.4. Os resultados da atividade de xilanase estão apresentados na figura 12 e mostram que a enzima manteve-se 100% estável até o tratamento a 60°C começando a sofrer desnaturação a partir desta temperatura, sendo que a 70°C apenas 22% da atividade inicial foi recuperada após o tratamento.

Os resultados da CMCase bruta mostram que a enzima foi 100% estável ao tratamento a 60°C e começou a sofrer desnaturação a partir desta temperatura. A 70°C, 68% da atividade inicial ainda foi recuperada após o tratamento (figura 12).

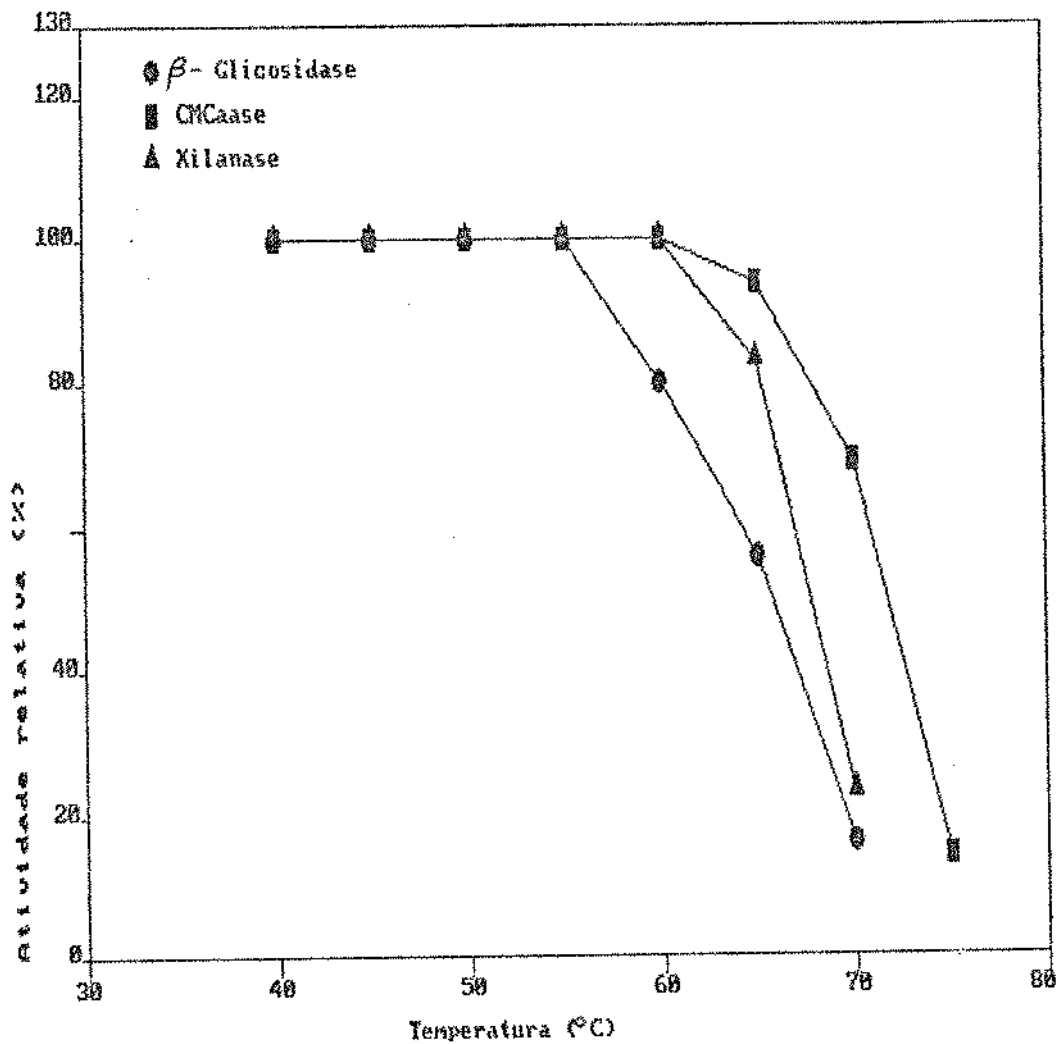


Figura 12: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas brutas.

As enzimas brutas foram incubadas sem os substratos em diferentes temperaturas por uma hora e a atividade residual foi determinada em soluções dos respectivos substratos em tampão acetato 0,1 M pH 5,0.

Como indicado na mesma figura 12, a β -glicosidase não perdeu atividade com o tratamento a temperaturas até 55°C. A 60°C a enzima reteve ainda, 80% da sua atividade e a 70°C, menos de 20% da atividade foi recuperada.

Comparando-se com trabalho de MISHRA et alii (1985) todas as enzimas apresentaram boa termoestabilidade e xilanase de Humicola sp foi mais termoestável que a xilanase de T. reesei QM 9414 (55°C por uma hora) e que a de P. funiculosum (50°C por 30 minutos) (MISHRA et alii, 1985). Entretanto as metodologias empregadas em outros trabalhos foram diferentes, dificultando as comparações.

4.5. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE HIDROLISE DOS SUBSTRATOS PELAS ENZIMAS BRUTAS

4.5.1. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A HIDROLISE DE XILANO PELA ENZIMA BRUTA

Com a finalidade de estabelecer a melhor temperatura para hidrólise de xilano, seguiu-se o procedimento descrito no item 3.2.14. As temperaturas empregadas foram 50, 55, 60, 65 e 70°C. A figura 13 mostra que a xilanase bruta hidrolisou o xilano numa extensão de 60% em relação à hidrólise ácida após 48 horas. Os resultados obtidos foram superiores àqueles descritos por MISHRA et alii (1985) para o fungo P. funiculosum (50% de hidrólise) e também mostraram que praticamente não houve diferença entre as temperaturas de 60 e 65°C para a hidrólise do xilano pela xilanase

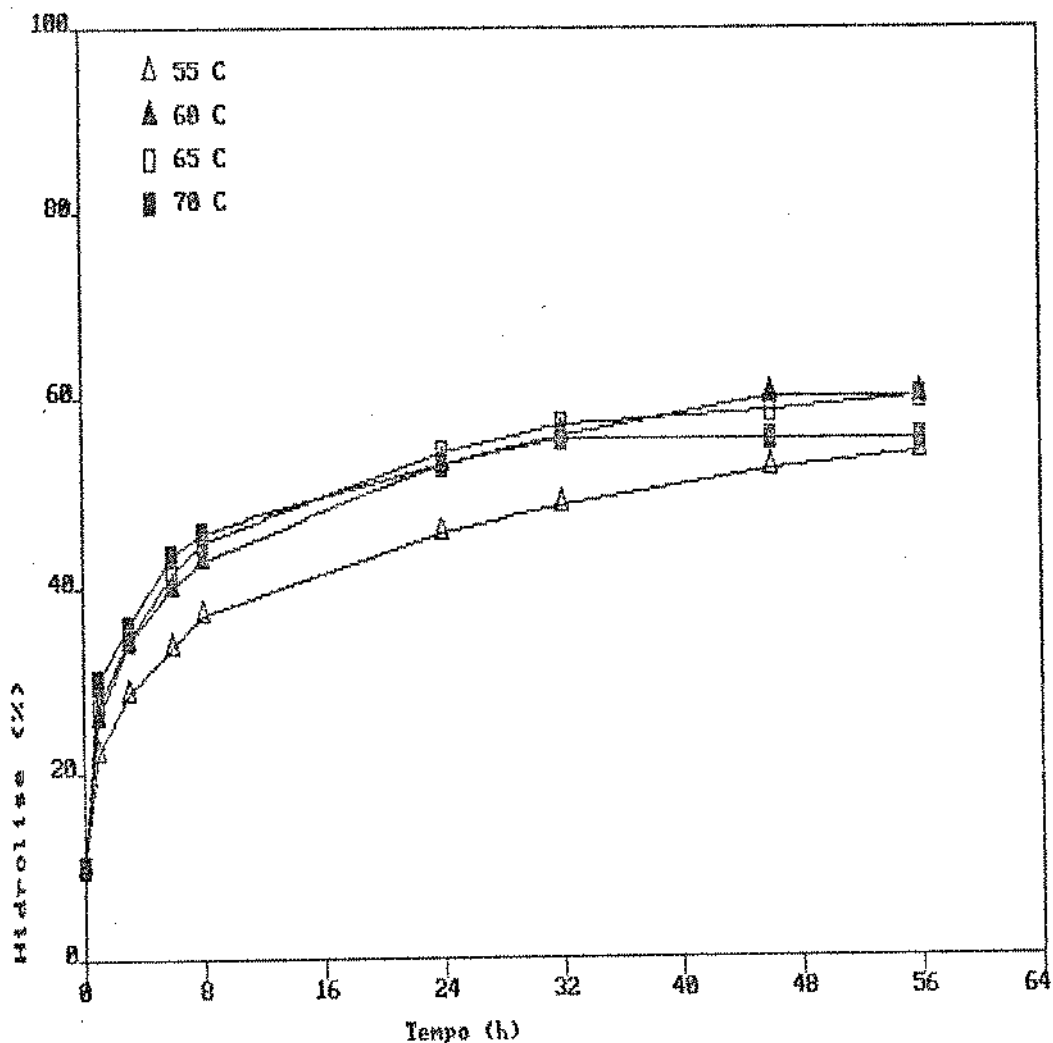


Figura 13: Efeito da temperatura sobre a hidrólise de xilano (Larchwood) pela enzima bruta.

A mistura de reação para hidrólise foi composta de 90 ml da solução de xilano 1% em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 10 ml da enzima bruta com 0,5 u/ml de atividade de xilanase. As misturas foram incubadas nas temperaturas indicadas e aliquotas foram retiradas nos tempos de 1, 3, 6, 8, 24, 32, 48 e 56 horas.

bruta.

4.5.2. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A HIDROLISE DE ARABINOXILANO PELA ENZIMA BRUTA

De forma semelhante ao experimento conduzido empregando xilano, este experimento foi realizado usando arabinosilano como substrato da xilanase bruta. O procedimento seguido foi descrito no item 3.2.14. Analisando a figura 14 podemos verificar que a melhor temperatura foi 65°C para tempos curtos de incubação (4 horas) e entre 20 e 22 horas não há diferença entre 60 e 65°C. Comparando os dois gráficos, xilano (figura 13) e arabinosilano (figura 14) pode-se observar que, para tempos curtos de hidrólise (4 a 6 horas), a xilanase bruta hidrolisa arabinosilano mais rapidamente que o xilano. Em 4 horas de incubação da enzima com os substratos, a taxa de hidrólise de arabinosilano é duas vezes maior que a taxa de hidrólise de xilano. Entretanto em tempos de hidrólise mais prolongados (acima de 20 horas) a porcentagem de conversão dos dois substratos tendem ao mesmo valor, ou seja, 60%.

4.5.3. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A HIDROLISE DE CMC PELA ENZIMA BRUTA

Seguindo-se procedimento descrito no item 3.2.14., determinou-se qual a melhor temperatura para hidrólise de CMC pela enzima bruta. A taxa de grupos redutores produzidos, expressos como glicose, em função do tempo é apresentado na figura 15. Observa-se que em tempos iniciais de hidrólise, 8 horas, as temperaturas maiores, 70 e 65°C, são mais efetivas na conversão, entretanto

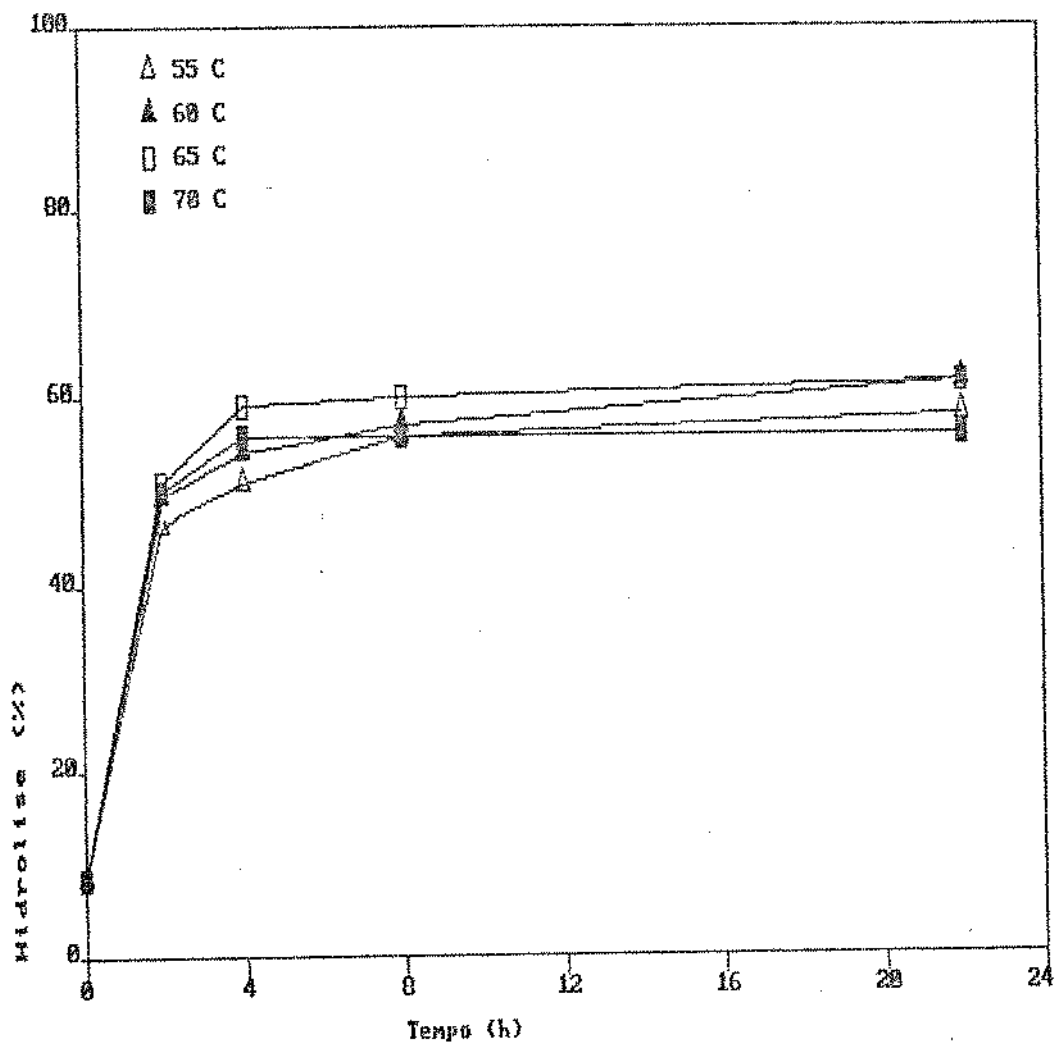


Figura 14: Efeito da temperatura sobre a hidrólise de Arabinoxilano (Oat spelt) pela enzima bruta.

A mistura de reação para a hidrólise foi composta de 90 ml da solução de xilano 1% em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 10 ml da enzima bruta com 0,5 u/ml de atividade de xilanase.

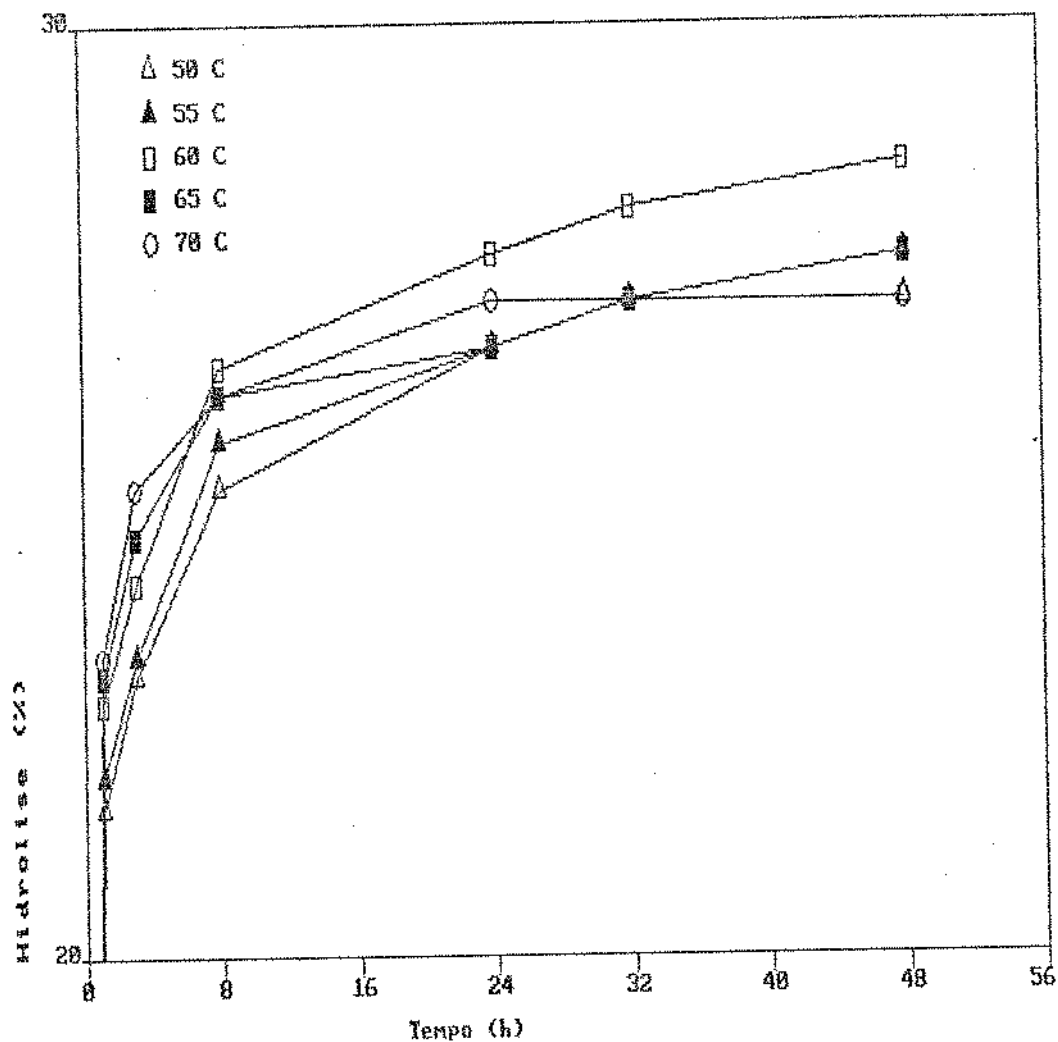


Figura 15: Efeito da temperatura sobre a hidrólise de CMC pela enzima bruta.

As misturas de reação para a hidrólise foram compostas de 90 ml da solução de CMC 1% em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 10 ml da enzima bruta com 0,5 u/ml de atividade de CMCase. As misturas foram incubadas nas temperaturas indicadas e aliquotas foram retiradas nos tempos de 0, 1, 3, 8, 24, 30 e 48 horas.

em tempos mais prolongados, 48 horas, 60°C apresentou melhor resultado. Nestas condições a extensão da hidrólise de CMC obtida foi de 28%. Resultado semelhante foi obtido por HAYASHIDA & YOSHIOKA (1980) trabalhando com H. isolens YH-8. Acompanhamento por cromatografia em papel do hidrolisado resultante mostrou unicamente glicose como resultado da sacarificação, indicando presença de β -glicosidase em níveis elevados, ao contrário do que acontece com o fungo I. reesei que é deficiente nesta enzima (RYU & MANDELS, 1980; DUFF et alii, 1986).

4.5.4. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE HIDROLISE DE VÁRIOS β -GLICANOS PELA ENZIMA BRUTA

As curvas de hidrólise dos substratos celulósicos e hemicelulósicos foram determinadas seguindo-se procedimento descrito no item 3.2.14. Os resultados são apresentados na figura 16. A temperatura de sacarificação foi 60°C. A degradação dos diferentes β -glicanos pelo filtrado da cultura, mostram que várias enzimas hidrolisantes dos β -glicanos estão presentes no filtrado. Arabinoxilano, xilano, CMC e celulose microcristalina foram hidrolisados numa extensão de 60, 60, 30 e 5%, respectivamente, ao final de 48 horas. Diferente de outros resultados anteriormente relatados para H. isolens (HAYASHIDA & YOSHIOKA, 1980), a linhagem em estudo produziu pequena quantidade das enzimas hidrolisantes de celulose microcristalina (avicelase ou celulase C₁), nas condições de fermentação utilizadas (ausência de avicel no meio de produção da enzima). A hidrólise de CMC, 30%, não foi muito diferente de resultados publicados por outros autores (YOSHIOKA et alii, 1982) e apenas glicose apareceu como produto neste hidrolisado, como foi

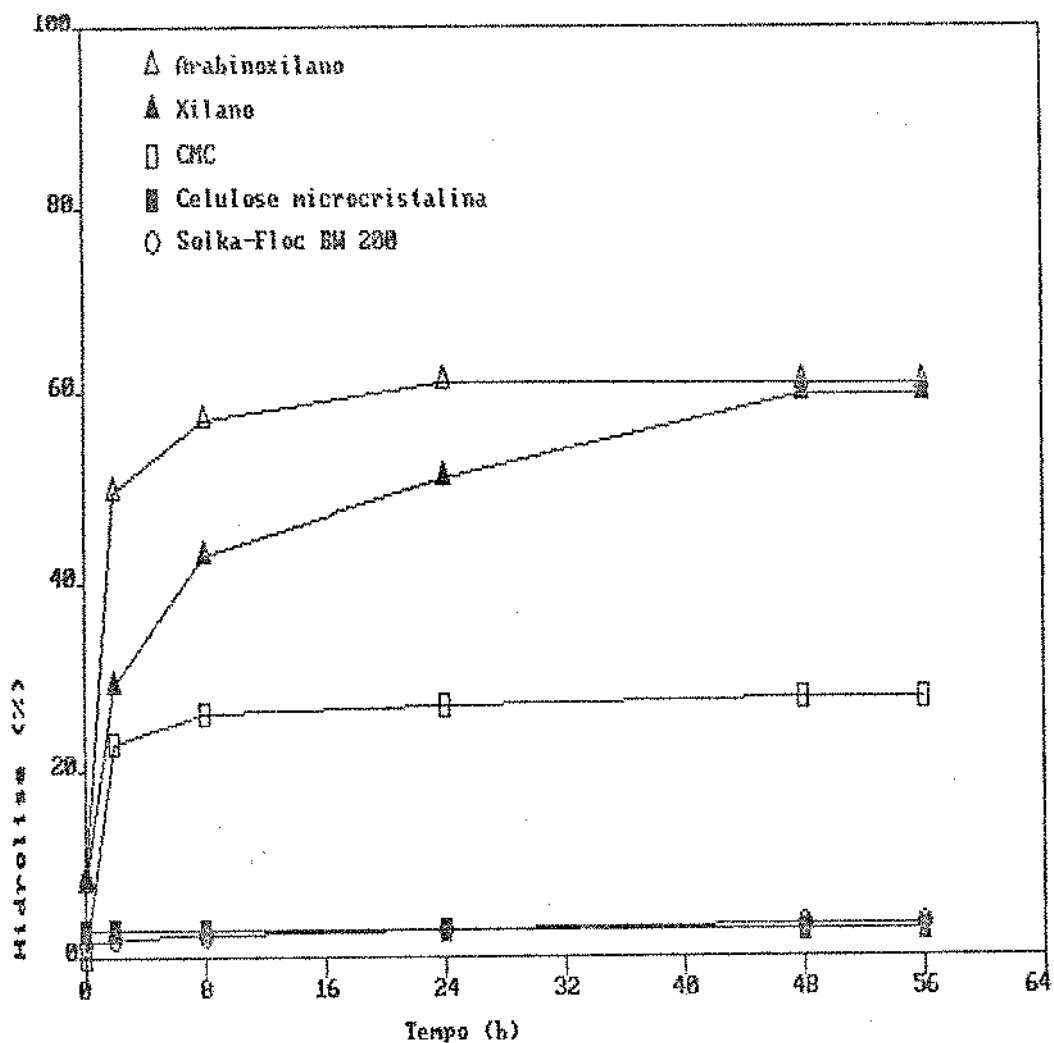


Figura 16: Curvas de hidrólise de diferentes β -glicanos pelas enzimas brutas.

As misturas de reação para a hidrólise foram compostas de 90 ml da solução dos respectivos substratos na concentração de 1% em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 10 ml da enzima bruta com 0,5 u/ml das respectivas atividades. As misturas foram incubadas a 60°C e alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 2, 8, 24, 48 e 56 horas.

constatado por cromatografia em papel, indicando presença de β -glicosidase no filtrado, o que foi confirmado por análise posterior com o substrato PNPG.

O filtrado mostrou elevada taxa de sacarificação de xilano e arabinexilano, produzindo uma taxa de hidrólise do xilano da ordem de 60% como xilose. Análise global da figura sugere um perfil de atividade sacarificante dos β -glicanos pelo fungo isolado, mais dirigida para ação hemicelulolítica do que celulolítica. Considerando que a remoção de xilano sem a degradação da celulose é de interesse industrial, por ex., produção de raíom (seda sintética), polpa de papel, etc. (PAICE & JURASEK, 1984) e que o pré-tratamento para a remoção de celulases das preparações brutas enzimáticas da maioria dos microrganismos lignocelulolíticos é oneroso, o perfil das atividades lignocelulósicas do fungo em estudo mostrou-se promissor para aplicação industrial deste tipo.

4.6. PURIFICAÇÃO DO SISTEMA XILANASE

4.6.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA

Conforme procedimento descrito no item 3.2.9.1., foi obtido um volume de 1.500 ml de extrato enzimático, após a filtração do meio sólido fermentado. O extrato enzimático livre de células apresentou um teor de 1.841 mg de proteínas totais com as seguintes atividades enzimáticas, expressas em unidades totais: xilanasase, 113.156, xilosidase 49 e arabinosidase 78.

4.6.2. PRECIPITAÇÃO COM ETANOL

Conforme procedimento descrito no item 3.2.9.2, foram obtidos dois gramas de precipitado etanólico. Uma alíquota do precipitado apresentando 510 mg de proteínas totais com 11.840 U de xilanase, 43 U de xilosidase e 72 U de arabinofuranosidase foram usadas para a cromatografia em DEAE-Sephadex.

4.6.3. CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHADEX A-50

O procedimento seguido nesta etapa, foi descrito no item 3.2.9.3.. O perfil de eluição apontado na figura 17, mostra que a atividade xilanase foi obtida em 3 picos, designados frações X-I, X-II e X-III. As proteínas da fração X-I, não se ligaram à resina e foram eluídas no tampão de eluição, num volume correspondente ao volume morto da coluna, sem necessidade de sal. As proteínas das frações X-II e X-III interagiram fortemente com a resina e foram eluídas apenas com o gradiente salino. Determinação de atividades β -xilosidases e α -L-arabinosidases mostraram que estas atividades estavam associadas às frações X-II e X-III respectivamente. As frações correspondentes aos picos de cada atividade xilánásica, foram juntadas e dializadas contra água destilada por 12 horas e concentradas por liofilização.

A ocorrência de formas múltiplas de xilanases são descritas para muitos microrganismos (DEKKER, 1985; FREDERICK et alii, 1985; MONTI et alii, 1991; YOSHIOKA et alii, 1981; WONG et alii, 1988). MONTI et alii (1991) documentaram que H. grisea var. ther-

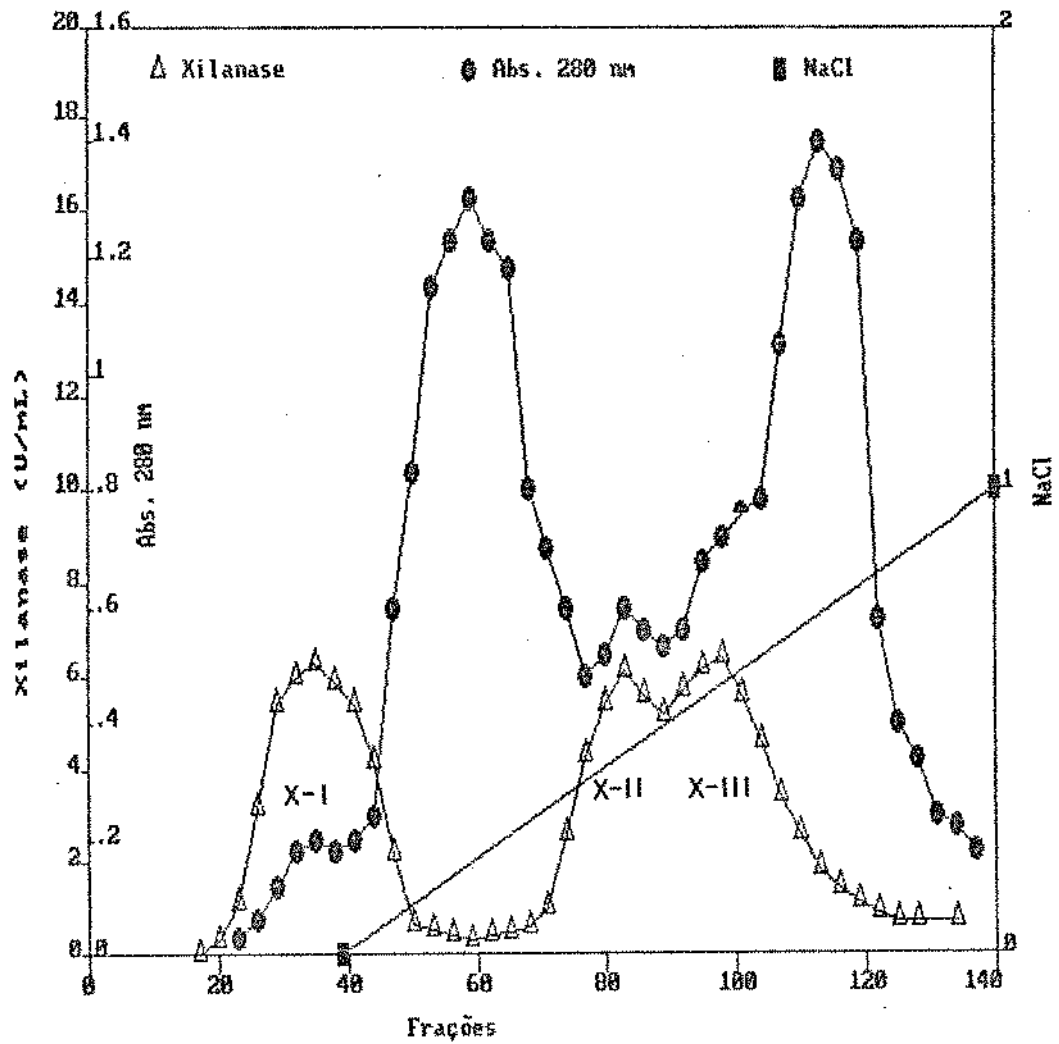


Figura 17: Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50.

As atividades foram determinadas usando xilano. A coluna (2,0 x 56 cm) foi eluída com tampão acetato 0,1M pH 5,0 e o fluxo foi de 5,5 ml/30 min.

moidea 17-RP apresentou duas formas de xilanases, uma das quais não se ligou à resina de DEAE-celulose. A função dessa multiplicidade de formas de xilanases pode ser uma estratégia usada pelo microrganismo para obter percentual elevado de hidrólise do xilano (WONG et alii, 1988).

4.6.4. CROMATOGRAFIA EM CM-SEPHADEX C-50

As três frações obtidas no passo anterior foram aplicadas à coluna de CM-Sephadex C-50, resina de troca catiônica. O procedimento empregado, está descrito no item 3.2.9.4. O resultado da cromatografia da xilanase X-I, apresentado na figura 18, mostra que a enzima foi eluída como um único pico simétrico de atividade e proteína. O pico mostra que a enzima foi eluída a uma concentração de aproximadamente 0,4 M de solução salina. Os resultados posteriores de eletroforese mostraram que após este passo a enzima estava completamente pura.

As cromatografias das frações X-II com atividade xilosidase e X-III com atividade arabinofuranosidase são apresentadas nas figuras 19 e 20 respectivamente.

Após a purificação final em CM-Sephadex C-50, os rendimentos e a pureza de cada uma das três xilanases em cada passo foram sumarizados na tabela 3. A atividade específica da xilanase I, xilanase II e xilanase III após a purificação final foram 585 unidades mg^{-1} , com uma recuperação de 13,3%, 2,7 U/mg^{-1} com uma recuperação de 3,9% e 109 U/mg^{-1} com uma recuperação de 2,0% respecti-

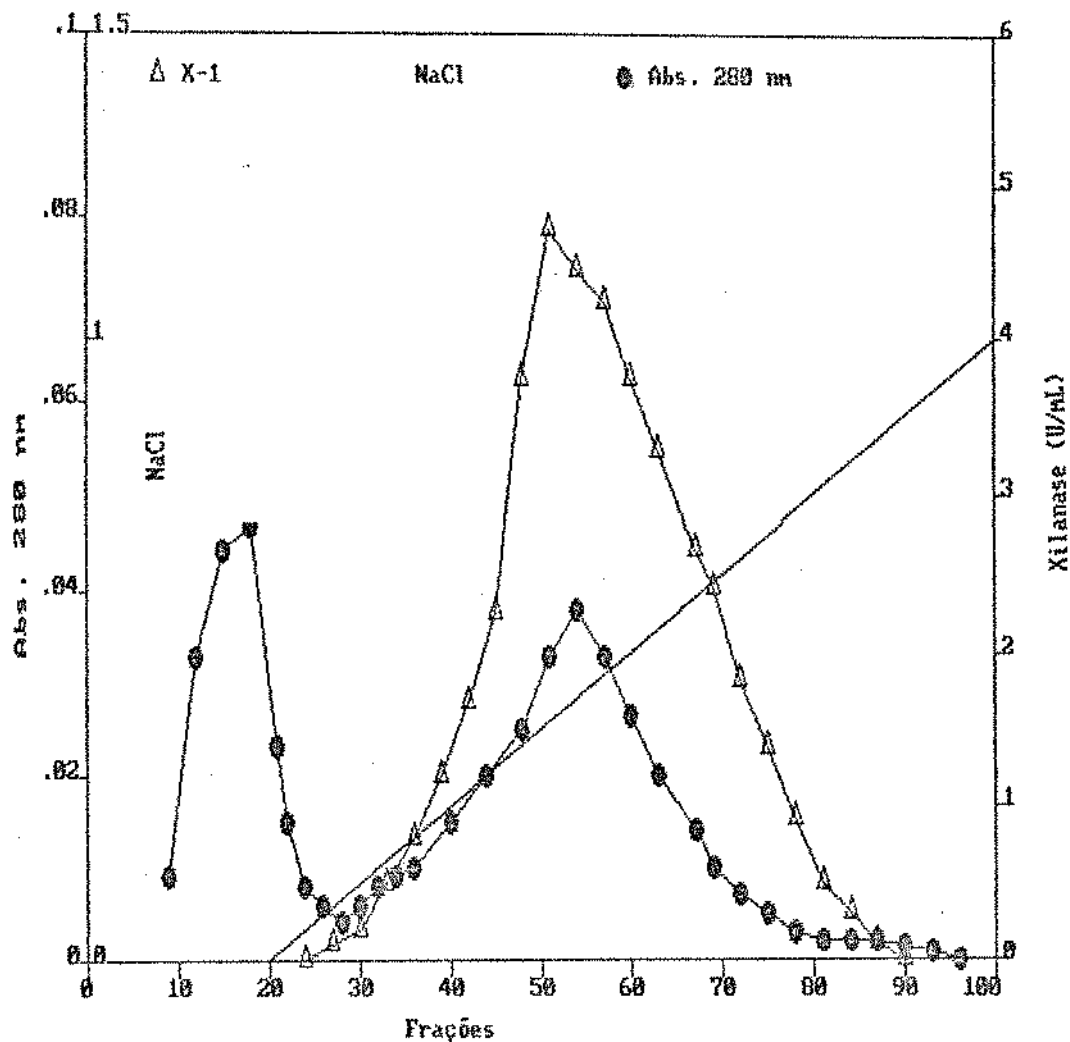


Figura 18: Cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 da Fração X-I.

Atividade determinada com xilano.

A coluna (2.0 x 56 cm) foi eluída com tampão acetato 0,05 M pH 5,0, fluxo de 5,5 ml/30 min. e foram coletados 5,5 ml por tubo.

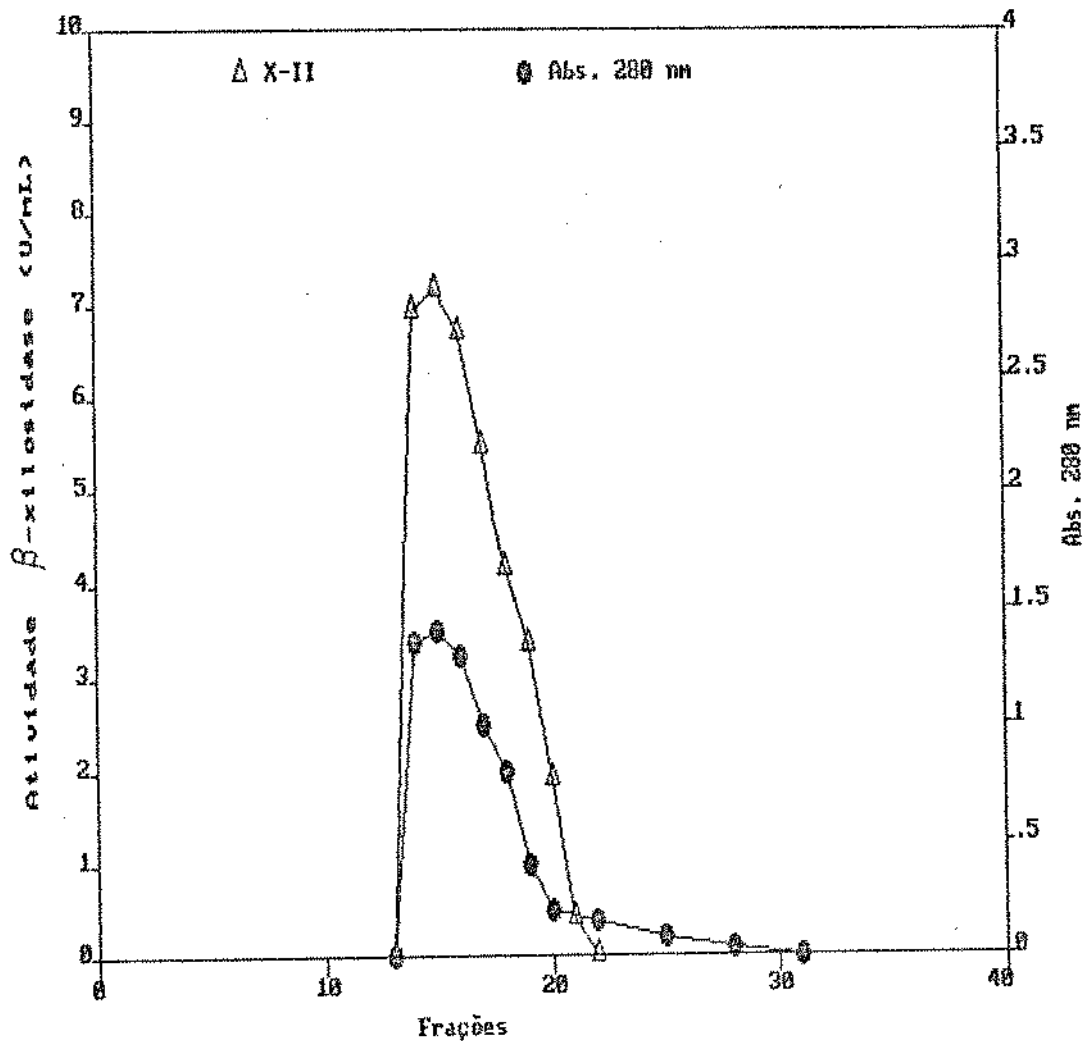


Figura 19: Cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 da Fração X-II.

Atividade determinada com p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo.

A coluna foi eluída com tampão acetato 0,1 M pH 5,0, fluxo de 5,5 ml/30 min. e foram coletados 5,5 ml por tubo.

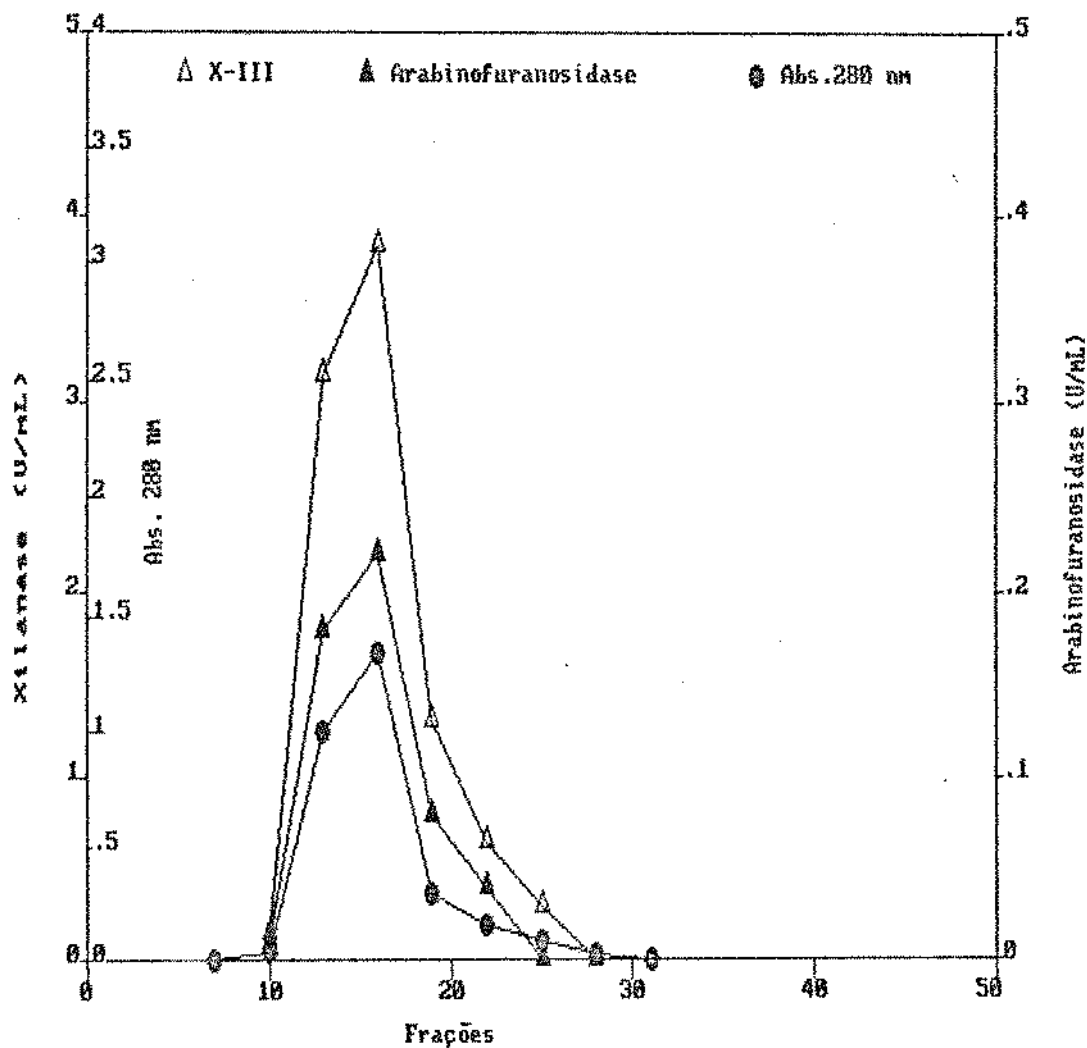


Figura 20: Cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 da Fração X-III e da arabinosidase.

X-III, atividade determinada com xilano.

Arabinosidase, atividade determinada com p-nitro-fenil- α -L-arabinofuranosideo.

A coluna foi eluída com tampão acetato 0,1 M pH 5,0, fluxo de 5,5 ml/30 minutos e foram coletados 5,5 ml por tubo.

Etapas	Proteína Total	Atividade Total (Unidades)	Atividade Específica (U/mg Prot.)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
1. Meio fermentado filtrado					
- xilanases	1.841	13.156	7,1	1,0	100
- xilosidase	1.841	49	0,03	1,0	100
- arabinosidase	1.841	78	0,04	1,0	100
2. Precipitado com etanol					
- xilanases	510	11.840	23	3,2	90,0
- xilosidase	510	43	0,09	3,0	87,7
- arabinosidase	510	72	0,14	3,5	92,3
3. DEAE-Sephadex A-50					
- X-I(endoxilanase)	18,0	5.760	320	45,0	43,7
- X-II(xilosidase)	7,0	17	2,5	83,0	34,7
- X-III(endoxilanase)	6,2	443	71	10,0	3,4
- Arabinosidase	6,2	22	3,5	87,5	28,2
4. CM-Sephadex C-50					
- X-I(endoxilanase)	3,0	1.755	585	82,0	13,3
- X-II(xilosidase)	0,7	1,9	2,7	90,0	3,9
- X-III(endoxilanase)	2,5	273	109	15,0	2,0
- Arabinosidase	2,5	13,7	5,5	137,5	17,5

Tabela 3: Resumo do processo de purificação do sistema de xilanases do Humicola sp 179-5.

X-I e X-III; Atividades determinadas com xilano (Metodologia no item 3.2.6.1)

X-II(xilosidase), Atividade determinada com P-nitrofenil- -D-xilopiranosídeo (Metodologia no item 3.2.6.4.)

Arabinosidase: Atividades determinadas com P-nitrofenil- -L-arabinofuranosídeo (Metodologia no item 3.2.6.7.)

vamente. A arabinosidase apresentou atividade específica de 5,5 U/mg⁻¹ e recuperação de 17,5%.

Outras atividades enzimáticas também foram examinadas a partir das três xilanases e os resultados são mostrados na tabela 3. Pela análise dos resultados da cromatografia em papel, apresentados na figura 21, verificou-se o padrão de ação de cada xilanase. Ficou demonstrado que xilanase I hidrolisou tanto xilano Oat spelt quanto xilano larchwood purificado a xilose (mancha pequena), xilobiose (mancha grande) e xilotriose, demonstrando ação típica de endoxilanase.

A xilanase X-II hidrolisou o p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo, indicando atividade de xilosidase. Este resultado foi ainda, confirmado por cromatografia em papel dos hidrolisados de xilano purificado, como mostrado na figura 21. A maioria dos xilooligossacarídeos foram convertidos para xilose (figura 21-B), indicando que a enzima tinha uma ação típica de exo-enzima hidrolisando a partir de cadeia terminal dos xilooligosacarídeos. A ação da xilanase X-II é portanto, similar à xilosidase. A classificação exata desta enzima quanto ao seu modo de ação merece ser melhor avaliada posteriormente. Considerando que ela hidrolisou xilano para xilose seria oportuno qualificá-la como uma exoxilanase, entretanto sua hidrólise do substrato sintético PNP-X, revela uma atividade β -xilosidase. DEKKER (1985) e WOODWARD (1984) discutem este problema porque a confusão parece ser bastante comum. Estes autores recomendam que a única forma de distingui-las seria por espectroscopia de ressonância nuclear pelo fato de que a configuração do produto liberado pela ação de exoxilanase ficaria in-

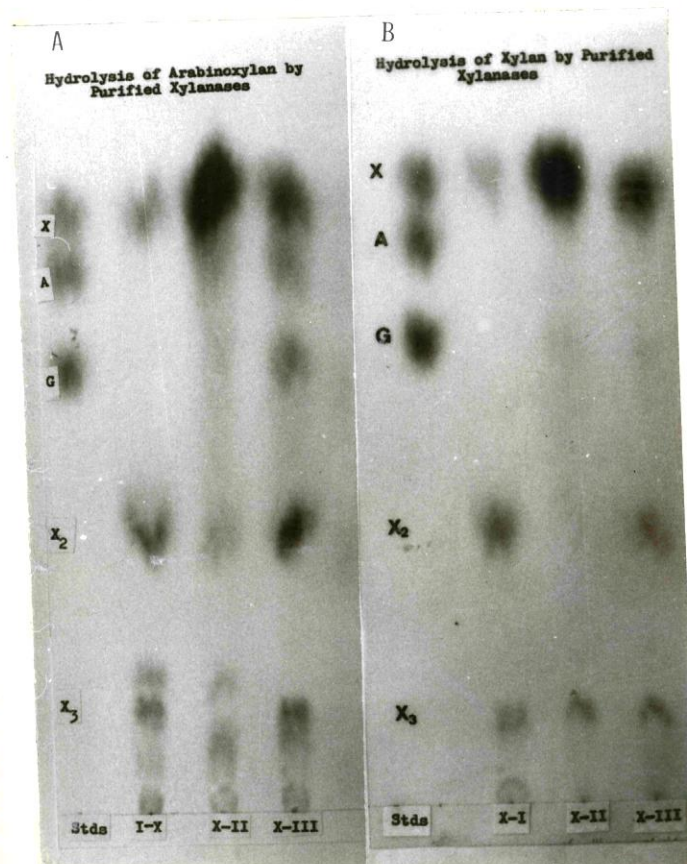


Figura 21: Cromatografia em papel dos hidrolisados de xilano pelas xilanases purificadas.

21-A: Produtos de hidrólise do arabinoxilano (xilano Oat Spelt), 21-B: Produtos de hidrólise do purificado (xilano Larchwood), Padrões: X, xilose; A, arabinose; G, glicose; X₂, xilobiose; X₃, xilotriose. Solvente acetato de etila-isopropanol-água (6:3:1) e revelação com AgNO₃-NaOH-etanol.

vertida, mas não pela ação de β -xilosidase. Não se pode descartar também a possibilidade da mesma proteína possuir dupla atividade catalítica, ou seja, uma exoxilanase com ação de β -xilosidase. Em função disso, por ora considerou-se esta enzima uma xilosidase.

A xilanase X-II também hidrolisou xilano oat spelt produzindo traços de arabinose e glicose (figura 21-A) devido a atividade de arabinosidase e possivelmente α -glicosidase como demonstrado na tabela 4. A fração X-III apresentou níveis de α -glicosidase e arabinosidase superiores à fração X-II (tabela 4) e por isto hidrolisou xilano oat spelt produzindo quantidades significativas de xilose, xilobiose, xilotriose, arabinose e glicose (Figura 21-A), o xilano Larchwood foi hidrolisado produzindo principalmente xilose, xilobiose e xilotriose demonstrando típica ação de endoxilanase (figura 21-B).

A análise por HPLC dos produtos da hidrólise das frações X-II e X-III sobre o arabinoxilano, também confirmaram a ação exo da fração X-II. Como mostra a figura 22-A, não se detecta xilobiose e xilotriose após ação da fração X-II sobre o polissacarídeo. Por outro lado, houve acúmulo de xilotetraose, sugerindo que este é o tamanho limite da ação hidrolisante da fração X-II sobre os oligoxilósídeos. A fração X-III (figura 22-B) mostrou uma mistura de xiloligossacarídeos, típicos de ação endo.

A formação de arabinose e glicose a partir do xilano (Oat Spelt) é devido a atividade de arabinosidase e outras enzimas descritas na tabela 4. Sabe-se que xilano consiste de um esqueleto de β -1,4-D-xilopiranosose que normalmente contém cadeias laterais

Enzimas	Atividades Enzimáticas (U/mg de proteína)			
	Precipitado do Etanol	X-I	X-II	X-III
Xilanase	23	585	430	103
Xilosidase	0,10	N.D	2,7	N.D
Arabinosidase	0,21	N.D	2,0	5,5
CMCase	9,7	N.D	140,0	270,0
Avicelase	0,02	N.D	N.D	N.D
-glicosidase	0,7	N.D	5,9	2,0
-glicosidase	0,05	N.D	1,6	3,0

Tabela 4 - Atividade das xilanases purificadas contra vários substratos

As atividades foram determinadas nas frações, seguindo procedimento do item 3.2.6.

N.D., não detectado

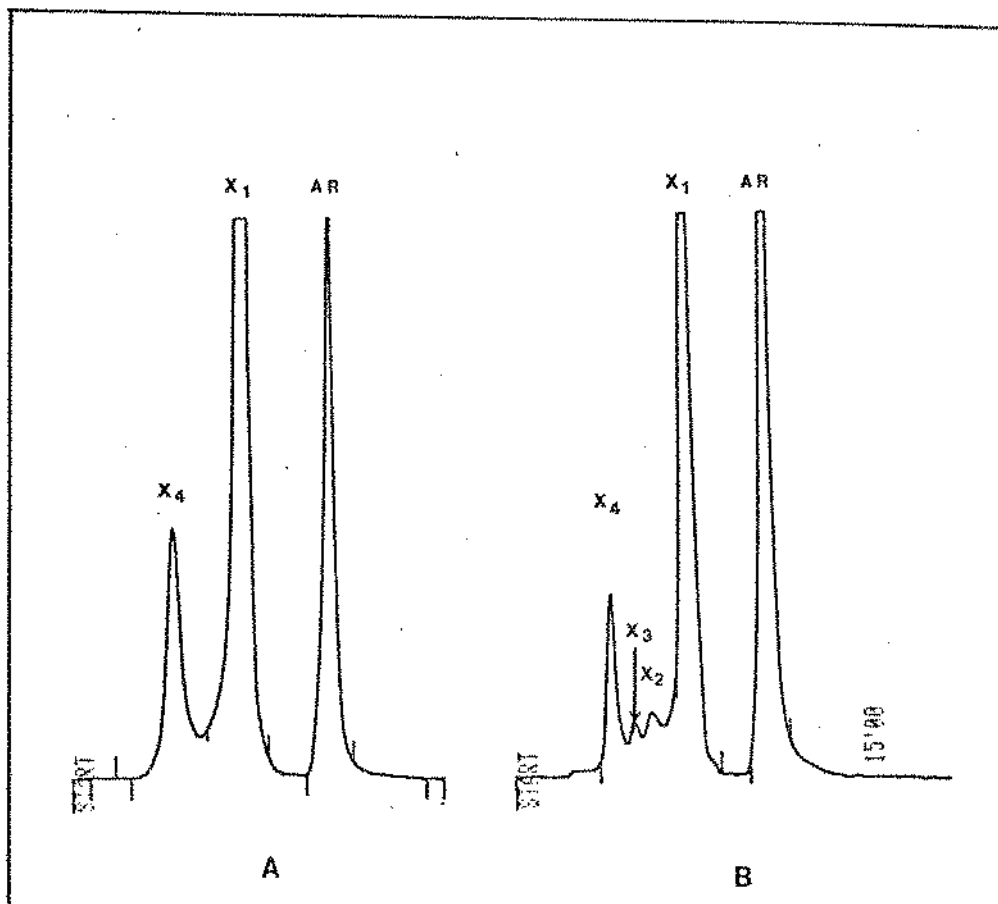


Figura 22: Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) dos produtos de hidrólise de arabinoxilano pelas xilanases purificadas.

22-A, Produtos da ação de X-II e 22-B, Produtos da ação de X-III.

X₁, xilose; X₂, xilobiiose; X₃, xilotriose; X₄, xilotetraose.

AR, Arabinose.

Coluna HPX 87 P 7,8 x 3000 mm (Birad) eluição com H₂O a 85°C e fluxo de 1 ml/min.

de L-arabinofuranoses ligados por ligações α -1,3 e D-glicopiranoses ligadas ao esqueleto por ligações α -1,4 ou seu 4-O-metil éter (WHISLER and RICHARDS, 1970; FULLS et alii, 1988). Xilano (Oat Spelt) contém aproximadamente 10% de arabinose e 15% de resíduos de glicose de acordo com informações da Sigma Co.

4.7. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS XILANASES PURIFICADAS

4.7.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS XILANASES PURIFICADAS

Conforme descrito no sub-item 3.2.13.1, a atividade enzimática foi medida a pH, de 2,0 a 10,0. Os resultados são apresentados na figura 23. O pH ótimo para as endoxilanases X-I e X-III foi de 5,0 a 5,5, entretanto a fração X-III apresentou uma curva ligeiramente mais ampla que a fração X-I, já que mais de 90% da atividade foi obtida na faixa de 4,5 a 6,5. O pH ótimo das endoxilanases (X-I e X-III) do Humicola sp foi muito próximo ao de outras xilanases microbianas, os quais, se encontram entre 4,0 e 6,0 (DEKKER & RICHARDS, 1976; YOSHIOKA et alii, 1981; WONG et alii, 1988; MONTI et alii, 1991). A fração X-II mostrou um pico mais estreito de atividade, centrado em 4,2 e uma queda de atividade mais acentuada fora deste valor. Este pH ótimo da xilosidase do Humicola sp foi bastante diferente dos valores obtidos por LEE & FORSBERG (1987) com β -xilosidase de C. acetobutylicum cujo valor foi 6,0 - 6,5 e para a enzima do fungo M. pulchella var. sulfurea com pH ótimo entre 6,2 - 6,8 descrita por MATSUO & YASUI (1988) que também descreveram as enzimas de I. viridis e E. nidulans com pH ótimo de 3,5 e 4,5 - 5,0, respectivamente.

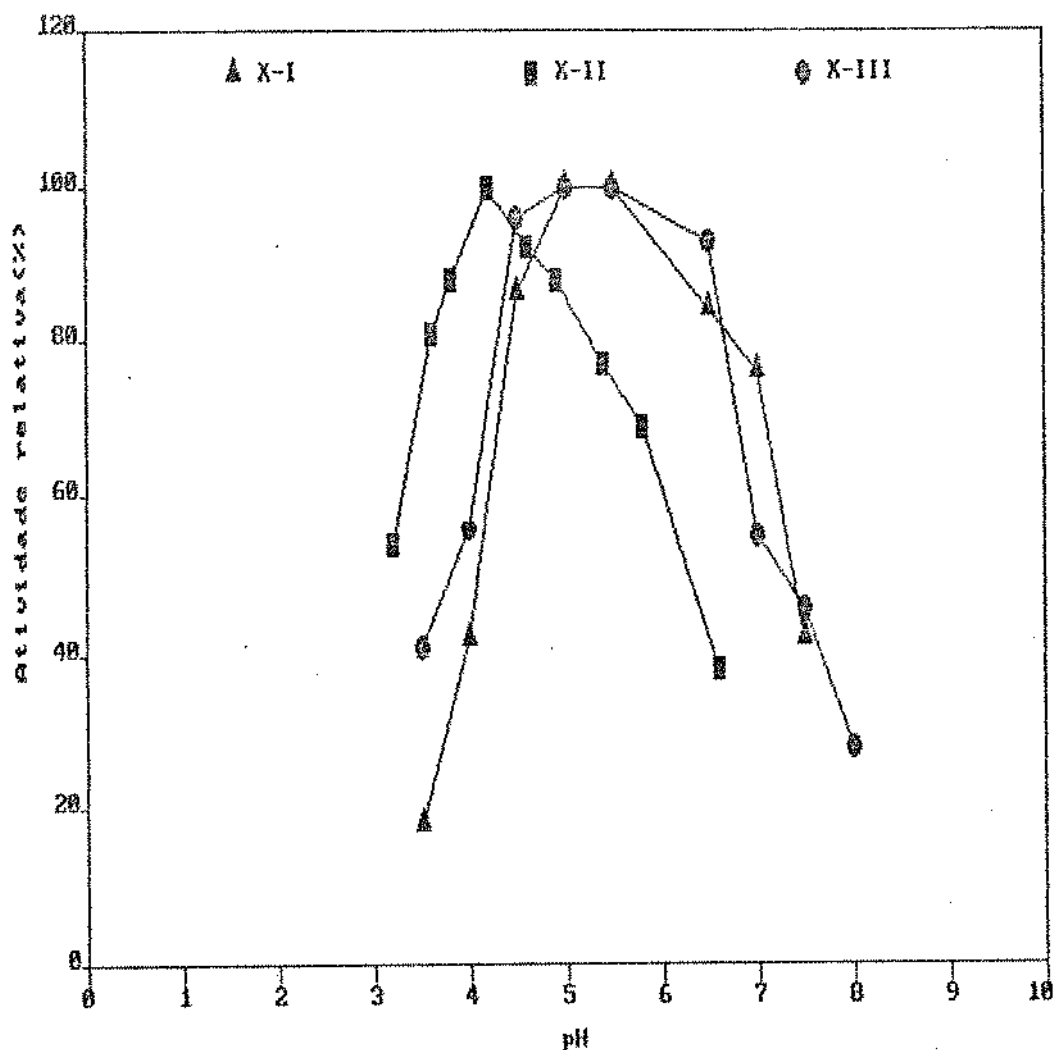


Figura 23: Efeito do pH sobre as atividades das xilanases purificadas.

pH 3,0 - 5,6 tampão acetato 0,1M

pH 5,6 - 8,0 tampão fosfato 0,1M

As atividades das enzimas X-I e X-III foram determinadas com xilano e a atividade da enzima X-II foi determinada com PNF-X nas soluções tampão indicadas e a 60°C por 10 minutos.

4.7.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DAS XILANASES PURIFICADAS

Conforme descrito no sub-item 3.2.13.1 a atividade enzimática foi medida incubando-se a enzima com o substrato em diferentes temperaturas por 10 minutos. Os resultados são mostrados na figura 24. A temperatura ótima da fração X-II foi 65°C e caiu acentuadamente em temperaturas abaixo ou acima deste valor. LACHKE (1988) descreveu uma β -xilosidase de S. rolfsii cuja temperatura ótima foi 50°C enquanto MATSUDO & YASUI (1988) descreveram as β -xilosidases de três fungos M. pulchella, T. viridae e E. nidulans com temperaturas ótimas a 50, 55 e 55°C, respectivamente. As endoxilanases X-I e X-III, apresentaram o mesmo valor de temperatura ótima de atividade a 75°C.

4.7.3. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS XILANASES PURIFICADAS

Conforme descrito no sub-item 3.2.13.3, a enzima foi incubada em diferentes valores de pH, sem o substrato, por 24 horas em temperatura ambiente e a atividade remanescente foi medida em tampão acetato 0,1 M pH 5,0. Os resultados são apresentados na figura 25. A fração X-II manteve 100% da atividade na faixa de 4,5 a 9,0, e começou a perder atividade lentamente quando o pH se aproximou de 3,0, e neste ponto reteve cerca de 80% da atividade original. A partir de 9,0, a atividade caiu e em 10,0 cerca de 73% da atividade foi recuperada.

As endoxilanases X-I e X-III mostraram comportamento distintos na faixa de pH ácido. A forma X-III reteve 100% da ati-

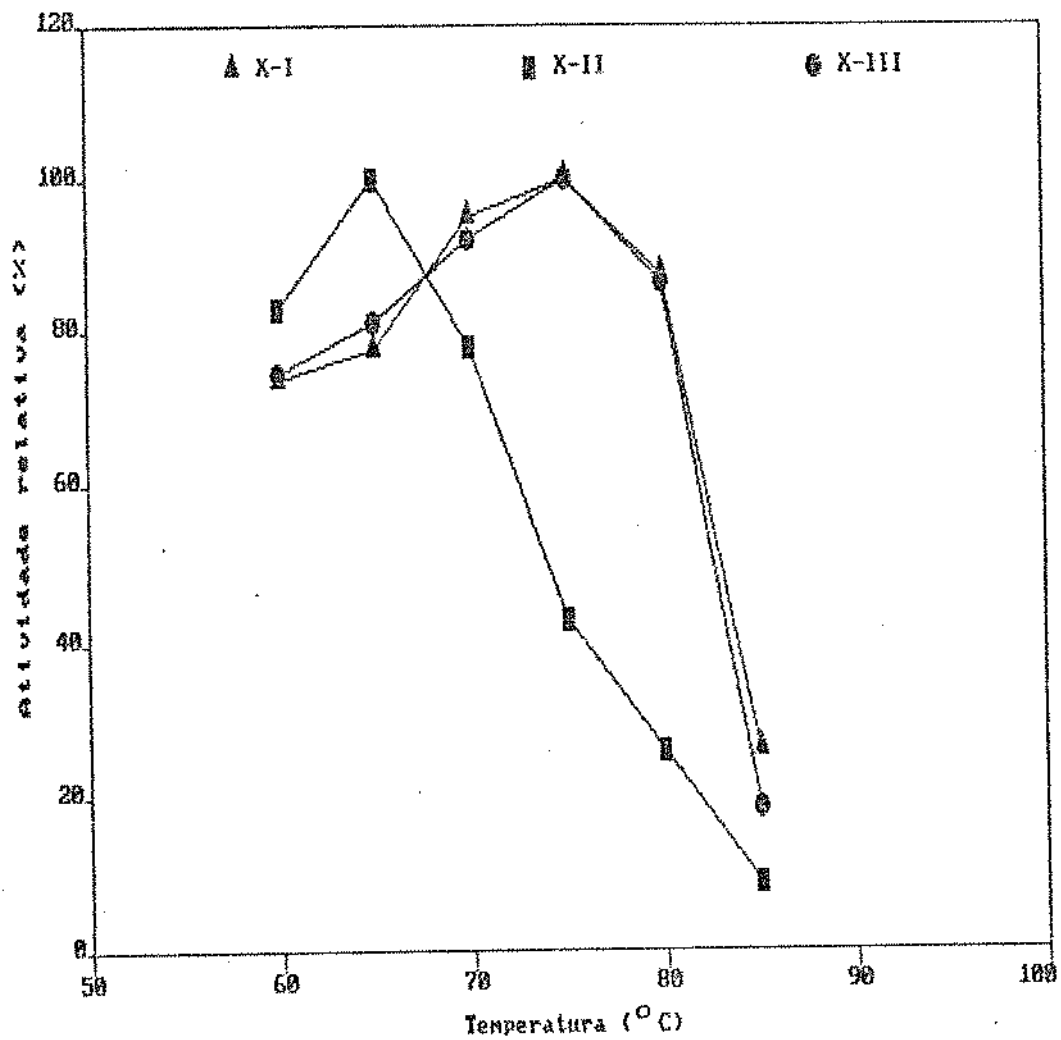


Figura 24: Efeito da temperatura sobre as atividades das xilanases purificadas.

X-I e X-III foram determinadas com xilano e X-II foi determinada com FNP-X, em tampão acetato 0,1M pH 5,0 a 60°C por 10 minutos.

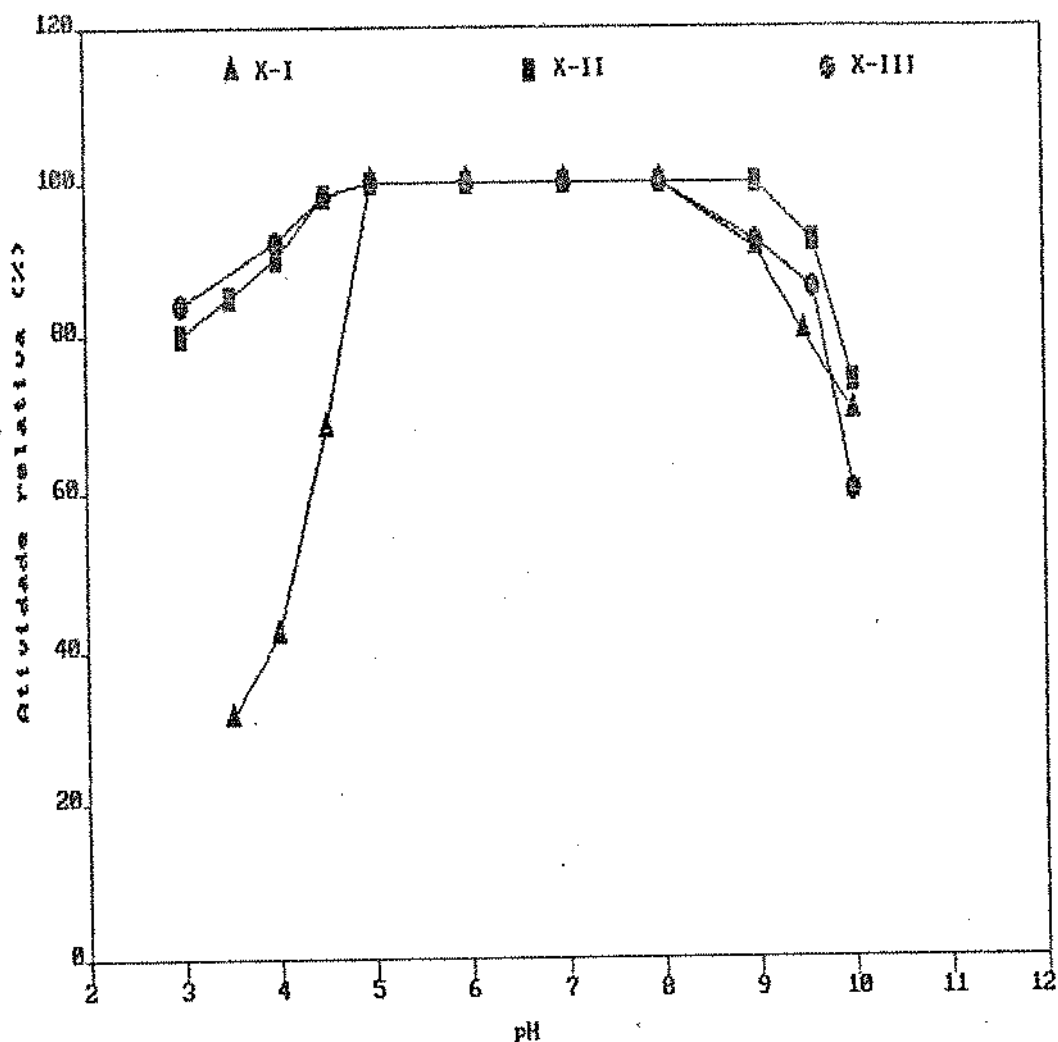


Figura 25: Efeito do pH sobre a estabilidade das xilanases purificadas.

2,2 -8,0, tampão McIlvaine 0,1M

8,0 - 9,0, tampão Tris-HCl 0,1M

9,0 - 11,0, tampão Gly-NaOH 0,1M

As enzimas foram incubadas sem o substrato em tampão de diversos valores de pH por 24 horas à temperatura ambiente.

A atividade residual foi determinada por tampão acetato 0,1M pH 5,0 a 60°C por 10 minutos.

X-I e X-III foram determinadas com xilano e X-II foi determinada com PNP-X.

vidade no tratamento de pH 4,5 e 80% da atividade ainda foi mantida em pH 3,0. Todavia, a forma X-I perdeu atividade acentuadamente quando o pH se afastou de 5,0 para baixo e em pH 4,0 apenas cerca de 40% da atividade foi recuperada. Em pH alcalino as duas tiveram comportamento semelhante e começaram a perder a atividade em pH acima de 8,0, mas em pH 10 cerca de 60% da atividade foi mantida em X-III e 68% em X-I. Confrontando estes resultados a literatura, pode-se verificar que as enzimas apresentaram boa estabilidade ao pH, exceto X-I, que foi instável na faixa ácida de pH. Segundo DEKKER (1976), as xilanases fúngicas normalmente apresentam estabilidade na faixa de 3,0 a 10,0, entretanto em seu trabalho a enzima foi incubada à temperatura de 5°C enquanto neste trabalho as enzimas foram incubadas à temperatura ambiente.

4.7.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS XILANASES PURIFICADAS

O experimento foi realizado conforme descrito no subitem 3.2.13.4. Os resultados apresentados na figura 26, foram obtidos após tratamento por uma hora. Como pode ser observado, todas as enzimas foram 100% estáveis até temperatura de 60°C. A fração X-II e a fração X-I perderam atividade a partir de 60°C, X-II foi mais instável que X-I e menos de 10% da atividade foi recuperada a 70°C, enquanto X-I ainda reteve cerca de 70% da atividade nesta temperatura. A endoxilanase X-III foi estável até 65°C e reteve cerca de 80% da atividade original no tratamento a 70°C. As endoxilanases X-I e X-III foram menos estáveis que as xilanases do Termonascus aurantiacus, que se mantiveram estáveis a 70°C por mais de 24 horas (TAN et alii, 1987) e do Talaromyces byssoclamydoideis,

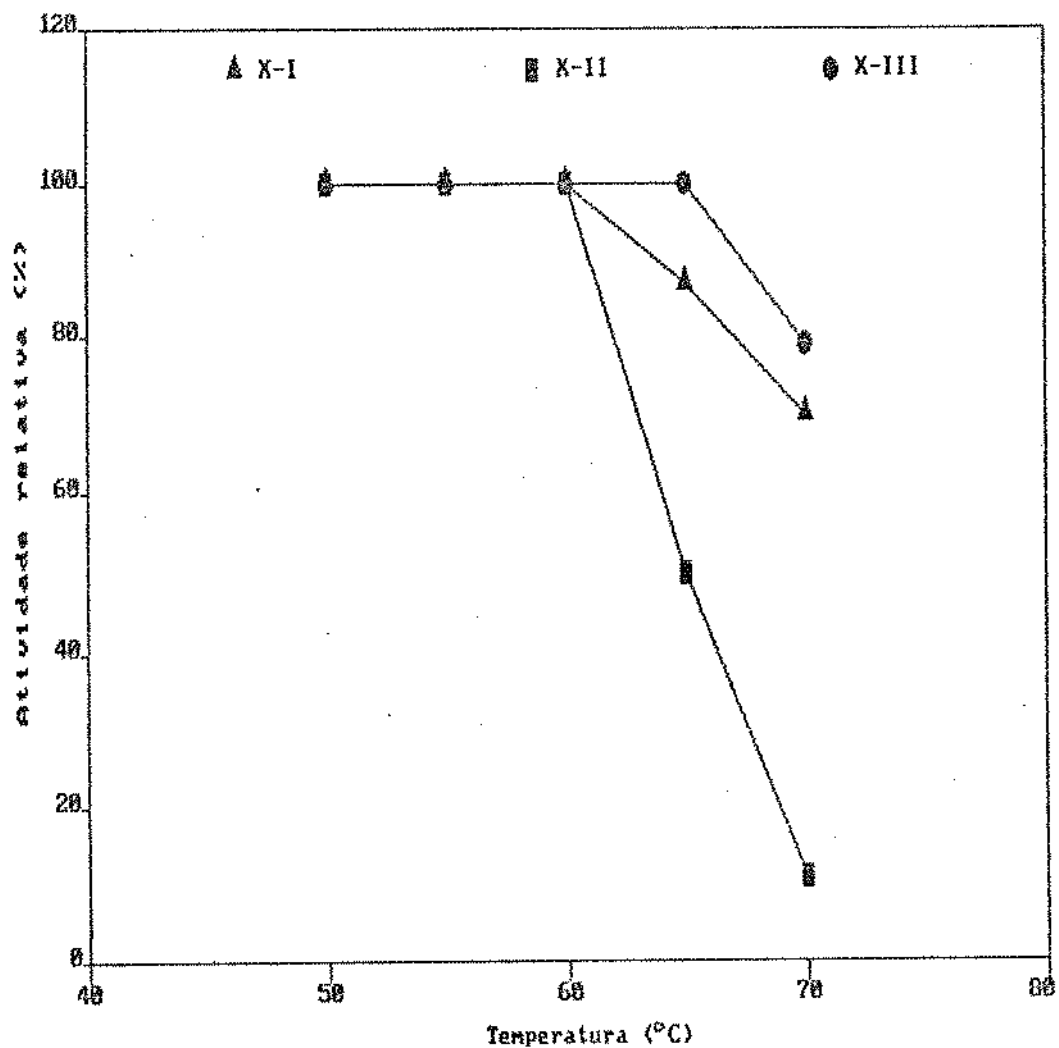


Figura 26: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das xilanases purificadas.

As enzimas foram incubadas sem o substrato em diferentes temperaturas por 1 hora e a atividade residual foi determinada em tampão acetato 0,1M pH 5,0.

X-I e X-III foram determinadas com xilano e X-II foi determinada com PNP-X

completamente estáveis a 70°C por 1 hora (YOSHIOKA et alii, 1981). Entretanto foram mais estáveis que a xilanase 2 do H. grisea var. thermoidea, que apresentou meia vida de 20 minutos a 60°C (MONTI et alii, 1991).

4.8.DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DAS XILANASE PURIFICADAS

Os pesos moleculares foram determinados por dois métodos.

4.8.1. FILTRAÇÃO EM GEL DE SEPHADEX G-200

A determinação dos pesos moleculares das xilanases purificadas e liofilizadas, por filtração em Sephadex G-200 seguiu o procedimento descrito no item 3.2.11.1.

Dextrana azul 2000 foi eluída na fração 23, marcando assim, o volume morto da coluna (V_0). As xilanases X-I, X-II e X-III foram eluídas nas frações 70, 62 e 62 respectivamente. Determinando a razão V_e/V_0 e entrando com estes valores na curva padrão de pesos moleculares (figura 27) estimou-se os pesos moleculares das xilanases X-I, X-II e X-III como 30.000 Da, 43.000 Da e 43.000 Da respectivamente.

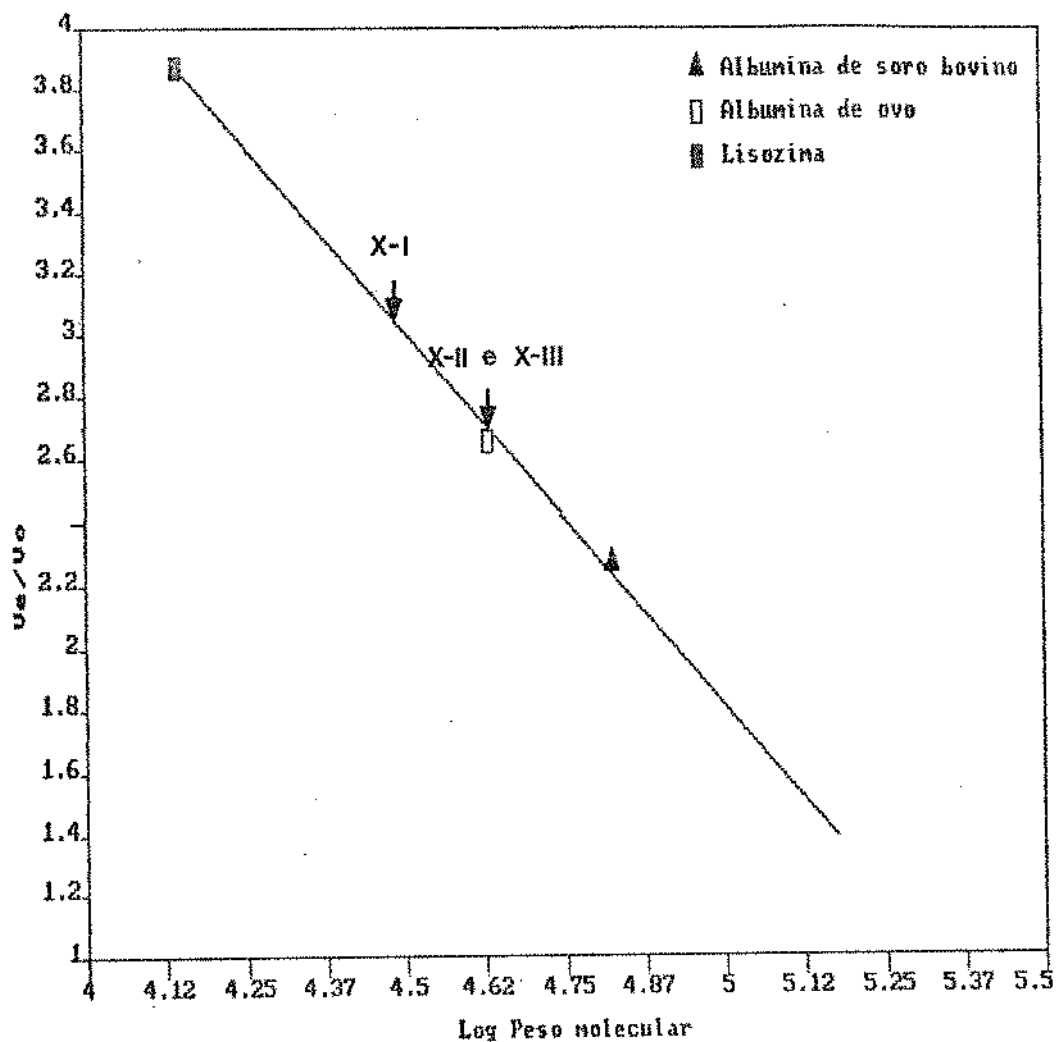


Figura 27: Determinação do peso molecular das xilanases purificadas por Cromatografia em Coluna de Sephadex G-200.

A coluna (2,0 x 100 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 a um fluxo de 16 ml/hora.

Padrões: albumina de soro bovino (67.000 Da), albumina do ovo (43.000 Da) e Lisozima (14.000 Da).

4.8.2. ELETROFORESE EM SDS-PAGE

Conforme descrito no item 3.2.11.2., os pesos moleculares foram determinados a partir da mobilidade relativa de seis proteínas padrões em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). As frações X-I e X-II mostraram uma única banda de proteína e pesos moleculares de 30.000 e 43.000 Da respectivamente (Figura 28), enquanto a fração X-III foi parcialmente purificada e não mostrou uma única banda de proteína. O peso molecular obtido para X-II foi muito menor que o obtido para β -xilosidase de Clostridium acetobutylicum relatado por LEE & FORSBERG (1987). Por outro lado, o peso molecular da endoxilanase X-I foi muito próximo dos 32.000 Da da endoxilanase purificada do Thermoascus aurantiacus por TAN et alii (1987), entretanto, foi maior que a endoxilanase de 23.000 Da do H. grisea var. thermoidea relatado por Monti et alii (1991) e foi menor que as três endoxilanasas do fungo termófilo Talaromyces byssichlamidoides YH-50 de 45.000, 54.000 e 76.000 Da, descritas por YOSHIOKA et alii (1981).

4.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE IONS METÁLICOS E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A ATIVIDADE DAS XILANASES PURIFICADAS

Verificado conforme metodologia do item 3.2.15., os efeitos dos vários íons e substâncias químicas sobre a atividade xilanase são apresentados na tabela 5. $HgCl_2$ inibiu completamente a atividade das três xilanases, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ inibiu fortemente as três enzimas e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e EDTA acarretaram inibição considerável. $ZnCl_2$ inibiu levemente as atividades

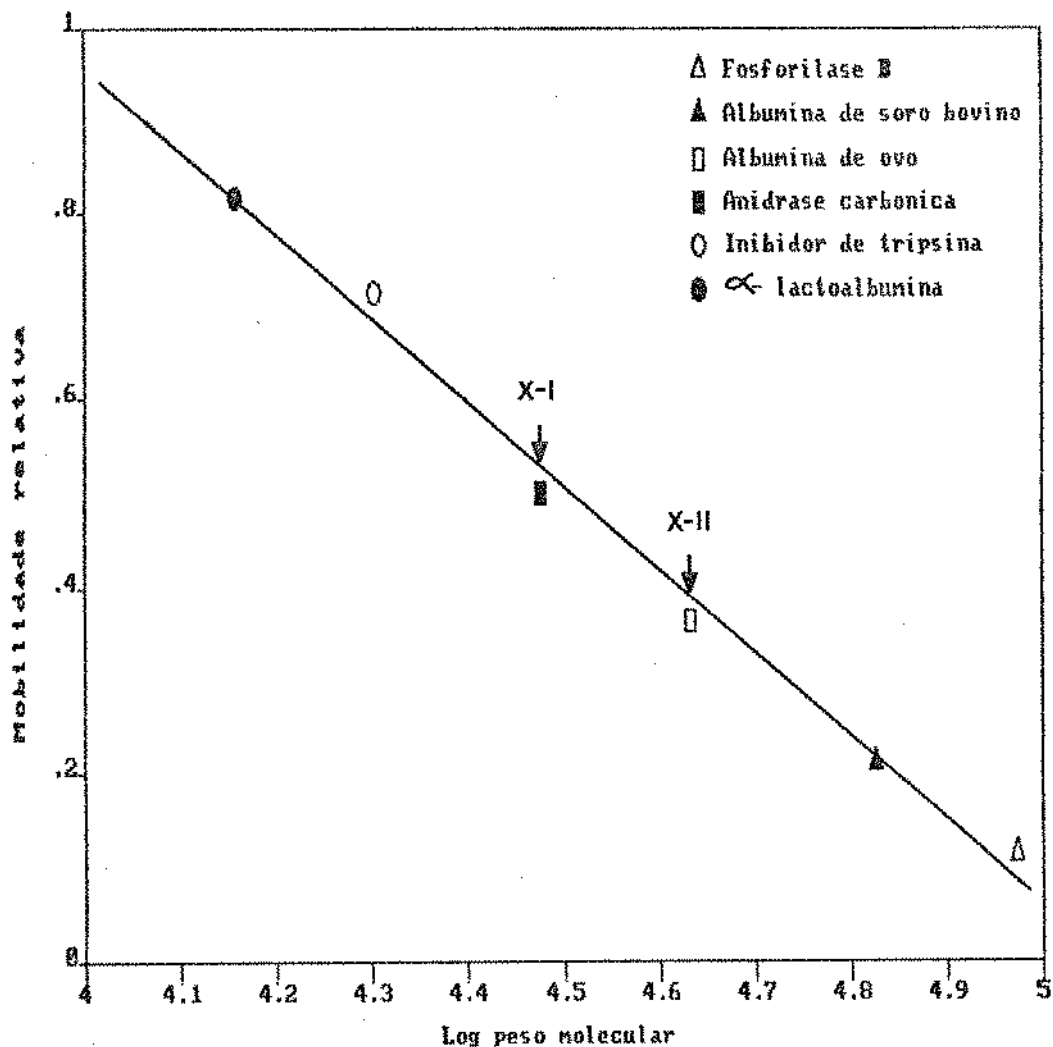


Figura 28: Determinação do peso molecular das xilanases purificadas por Eletroforese SDS-PAGE.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 10% em presença de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 contendo 0,2% de SDS.

Símbolos representam os padrões : ●, α-Lactoalbumina (14.400); ○, inibidor de tripsina (20.100); ■, anidrase carbônica (30.000); □, albumina do ovo (43.000); ▲, albumina de soro bovino (67.000) e △, fosforilase b (94.000).

$1 \times 10^{-3}M$	Atividade Xilanase Relativa		
	X-I	X-II	X-III
Controle	100	100	100
CaCl ₂	106	123	128
ZnCl ₂	90	93	96
KCl	100	100	100
BaCl ₂	100	100	102
MgSO ₄ .7H ₂ O	66	71	72
HgCl ₂	0	0	0
AgNO ₃	93	35	24
CUSO ₄ .5H ₂ O	18	15	24
CoCl ₂ .6H ₂ O	85	77	84
FeCl ₃ .5H ₂ O	81	58	66
EDTA	55	51	58
IODOACETAMIDA	100	100	100

Tabela 5 - Efeito de ions metálicos e inibidores nas atividades das xilanases purificadas

As substâncias químicas listadas foram adicionadas à solução de substratos antes da reação, para obter a concentração de $1 \times 10^{-3}M$. Após a adição da enzima à mistura de reação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.2.6.

das três enzimas e AgNO_3 inibiu substancialmente a atividade da X-II e X-III, e apenas levemente a atividade da X-I. Por outro lado, CaCl_2 estimulou a atividade das três xilanases. Iodoacetamida, KCl e BaCl_2 não tiveram efeito inibidor sobre as xilanases.

O efeito inibidor do Hg^{++} é muito potente e amplamente reconhecido. Seu efeito sobre a atividade enzimática sugere reação com grupos tióis. Além disso, Hg^{++} é reconhecido por reagir com grupos amino e imidazol da histidina, com ligações peptídicas e também por ser capaz de formar complexos de coordenação com grupos aminos e carboxílicos (DEKKER, 1976). EDTA reage com metais polivalentes, e dessa forma é possível que estes estejam envolvidos com as moléculas das enzimas purificadas (DEKKER, 1976). Como iodoacetamida não causou inibição em nenhuma fração xilanase, é possível que grupos $-\text{SH}$ não sejam imprescindíveis para atividade enzimática.

4.10. EFEITO DE SINERGISMO DAS XILANASES PURIFICADAS SOBRE HIDRÓLISE DO ARABINOXILANO

Conforme procedimento descrito no sub-item 3.2.14., as curvas de hidrólise do arabinóxilano apresentadas na figura 29, mostram o sinergismo da ação combinada das diferentes formas das enzimas xilanolíticas purificadas. As atividades enzimáticas foram controladas para 0,5 U/ml em cada ensaio. As endoxilanases X-I e X-III e a xilosidase X-II hidrolisaram o arabinóxilano a 50%, 62% e 70%, respectivamente como xilose, em 34 horas de incubação em suspensão de 1% do substrato. Os resultados estão de acordo com o padrão de atividade de cada uma das frações enzimáticas isolada

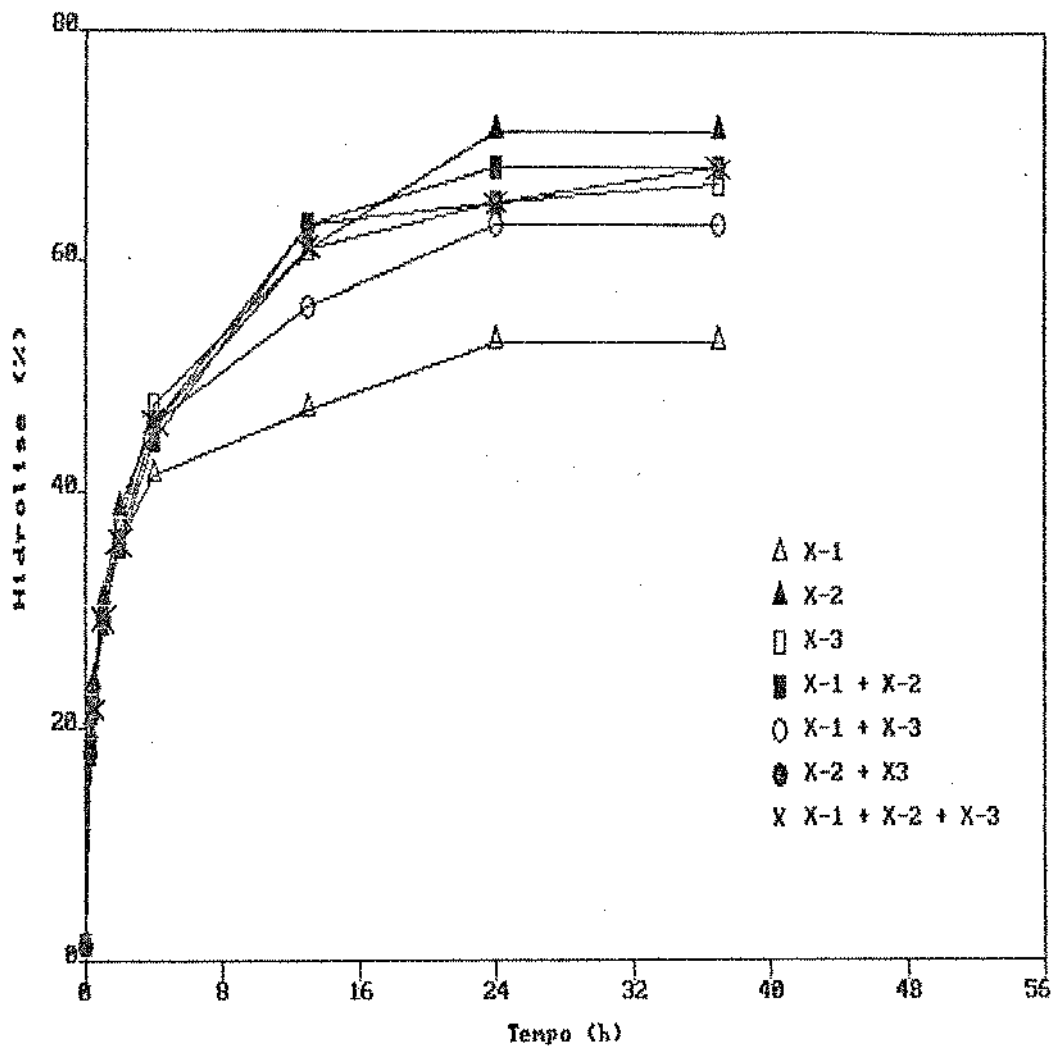


Figura 29: Efeito de sinergismo das xilanases purificadas sobre a hidrólise do arabinoxilano.

As misturas de reação foram compostas de 90 ml da solução de arabinoxilano 1% em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 10 ml das soluções de enzimas, como indicado (0,5 U/ml).

A mistura foi incubada a 60°C e alíquotas foram retiradas em 0,5, 1, 2, 3, 4, 14, 24 e 36 horas.

mente. X-II com sua atividade exo, produz uma maior sacarificação do xilano, que é detectada pela dosagem de açúcares redutores. As endoenzimas atuando internamente na molécula do polissacarídeo produzem menos grupos redutores. A fração X-II mostrou-se mais eficiente sozinha do que em conjunto com as outras frações, possivelmente porque alguns oligossacarídeos curtos produzidos pelas endoxilanases, dificultam a sua ação xilosidásica.

4.11. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA POLPA DE EUCALIPTO OBTIDA POR PROCESSO KRAFT.

Sabe-se que a polpa Kraft submetida a pré-tratamento com xilanases combinadas, seguido de branqueamento mostra uma melhoria na alvura e viscosidade quando comparada com polpa Kraft branqueada apenas por processo convencional (PAICE & JURASEK, 1984). O uso do pré tratamento com xilanase da polpa obtida do processo Kraft permite obter uma certa alvura e viscosidade necessitando menos quantidade de cloro durante a etapa de branqueamento (VIKARI et alii, 1986). Neste trabalho, foi realizado o tratamento enzimático da polpa de eucalipto obtida por processo Kraft branqueada que é usada para produzir papel. O branqueamento foi realizado por um processo de cinco etapas (C, Ep, H, D e H) que envolve tratamento com cloro livre (C), NaOH e peróxido (Ep), Hipoclorito de cálcio (H) e dióxido de cloro (D). A polpa, após o branqueamento, foi tratada por xilanases purificadas X-I, X-II, X-III e enzima bruta. Os resultados são apresentados na tabela 6, e a Figura 30 mostra os produtos da ação das enzimas sobre a polpa. As polpas tratadas com enzimas foram mais alvas que a polpa controle. Isto

Tratamentos	Alvura da polpa (%)	Viscosidade da polpa m Pas (cp)
Xilanase I	87,1	20,0
Xilanase II	87,3	16,0
Xilanase III	86,1	13,0
Precipitado Etanólico	87,1	19,5
Controle	85,8	19,0

Tabela 6 - Polpa de eucalipto obtida por processo Kraft e tratada com enzimas.

O controle significa o mesmo tratamento como descrito no item 3.2.16, sem a enzima.

As suspensões de polpa (1,5% base seca) foram preparadas em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e tratadas com 5,0 U das enzimas listadas. A mistura foi incubada a 50°C por 15 horas sem agitação. Após a incubação, a polpa foi lavada com água destilada e a alvura e a viscosidade foram determinadas conforme indicado no item 3.2.16.

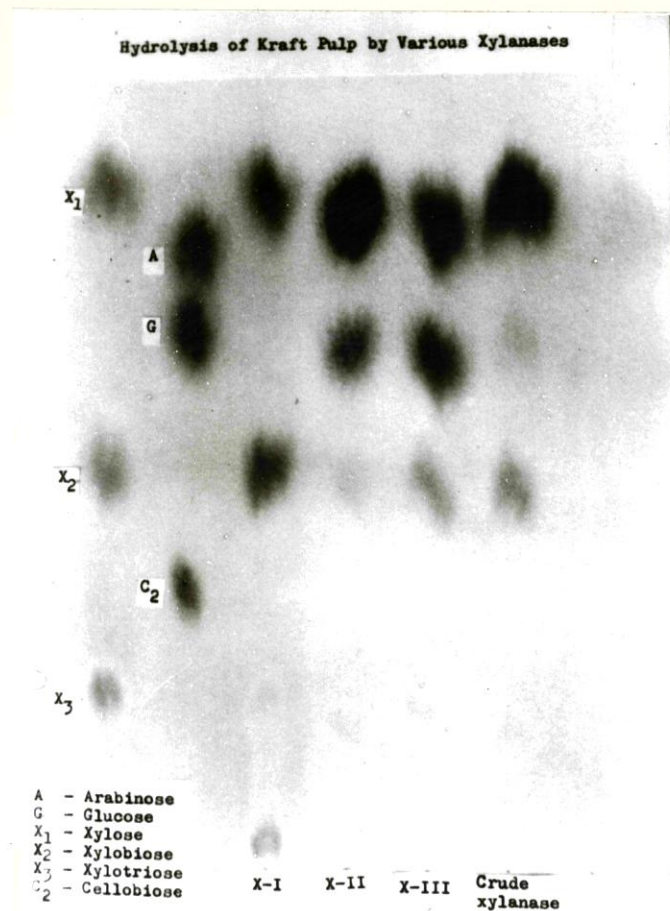


Figura 30: Cromatografia em papel dos hidrolisados da polpa de eucalipto pelas xilanases.

As suspensões de polpa (1,5% base seca) foram preparadas em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e tratadas com 5,0 U das enzimas listadas. A mistura foi incubada a 50°C por 15 horas sem agitação. Após a incubação aliquotas dos sobrenadantes de cada ensaio foram retiradas e analisadas em cromatografia em papel.

ocorreu, provavelmente, por uma perda de xilano, durante o tratamento enzimático. A viscosidade da polpa foi levemente maior para o tratamento com X-I e enzima bruta enquanto os tratamentos com X-II e X-III reduziram consideravelmente a viscosidade da polpa, indicando degradação das cadeias de celulose. Como está mostrado na tabela 3, xilanase III continha uma notável quantidade de atividade CMCase enquanto X-II continha uma quantidade menor. A enzima bruta aumentou a viscosidade da polpa muito levemente em relação ao controle, indicando que quantidade traço de CMCase não afetou a viscosidade. Destes resultados conclue-se que o simples extrato enzimático de cultura, pode ser aplicado a polpas para melhorar a qualidade da polpa de papel.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões extraídas do presente trabalho são:

1. Neste trabalho conseguiu-se isolar, a partir de madeira em decomposição da floresta Amazônica, uma linhagem de fungo termófilo xilanolítico apresentando características morfológicas e fisiológicas condizentes com a do gênero Humicola sp.
2. O estudo do conjunto das enzimas extracelulares do complexo lignocelulósico mostrou que o sistema celulolítico era incompleto e por isto ineficiente enquanto o sistema xilanolítico era completo e eficiente.
3. A purificação do sistema de xilanases por cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 e CM Sephadex C-50 apresentou três frações de proteínas denominadas X-I, X-II e X-III com atividade xilanases. A fração X-I não interagiu com DEAE-Sephadex.
4. As frações X-I e X-III são endoenzimas e a fração X-II é uma xilosidase (exoxilanase ou β -xilosidase). A fração X-I apresentou unicamente atividade de endoxilanase. As frações X-II e X-III tinham atividades DMCase e arabinosidase, sendo estas atividades superiores na fração X-III.

5. Todas as enzimas foram estáveis a 60°C por 1 hora. O pH ótimo e temperatura ótima da fração X-II foram 4,2 e 65°C respectivamente, enquanto aqueles das frações X-I e X-III foram 5,0-5,6 e 75°C.
6. Os pesos moleculares determinados por SDS-PAGE para as proteínas X-I e X-II foram 30.000 Da e 43.000 Da, respectivamente. X-III não foi homogênea.
7. Tratamento da polpa de eucalipto obtida por processo Kraft mostrou que X-I melhorou a qualidade geral do papel. X-II e X-III melhoraram a alvura mas reduziram a viscosidade, possivelmente por apresentarem CMCase que degradou celulose. A enzima bruta melhorou a qualidade do papel, sem reduzir a viscosidade, possivelmente por conter baixa atividade CMCase.
8. O microrganismo é promissor para aplicação industrial pois cresce rapidamente em condição estacionária em meio simples e de baixo custo e secreta as enzimas extracelularmente. A enzima bruta pode ser usada para eliminação de xilano contaminante de polpa de celulose. A purificação em apenas três etapas separa frações distintas e interessantes, por ex. X-I pode ser empregada para degradação de xilano de polpa ou produção de xilooligossacarídeos de proporção equilibrada e X-II pode ser usada para produção de xilose, sem necessidade de purificação, para fermentação ou conversão a xilitol.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ANDREWS, P. (1965) - The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96:595-606.
2. ARAUJO, E.F., BARROS, E.G., CALDAS, R.A. & SILVA, D.O. (1983) - β -glucosidase activity of the thermophilic and cellulolytic fungus Hemicola sp. *Biotechnol. Lett.*, 5:781-784.
3. AVGERINDS, G.C. & WANG, D.J.C. (1980) - Direct microbiological conversion of cellulose to ethanol. *Annual Rep. Ferm. Proc.*, 4:165-191.
4. BECK, C.I. and SCOTT, D. (1974) - Enzymes in foods: for better or worse. *Adv. Chem. Series.* 136:1-30.
5. BERENGER, J.F., FRIXON, C., BIGLIARDI, J. & CREUZET, N. (1985) - Production, purification and properties of thermostable xylanase from Clostridium stercorarium. *Can. J. Microbiol.* 31:635-643.
6. BIELY, P. (1985) - Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3:286-290.
7. BIELY, P., MACKENZIE, C.R. & SCHNEIDER, H. (1988) - Acetylxylan esterase of Schizophillum commune. *Methods enzymol.* 160:700-707.
8. BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. (1981) - Biodegradation of cellulosic materials substrats, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microbil. Technol.* 3:90-104.
9. CALLIHAN, C.D. & CLEMMER, J.E. (1979) - In: ROSE, A.H. (ed.) *Microbial Biomass*. New York: Academic Press, p. 271.

10. CHAHAL, D.S. (1985) - Pretreatment of lignocelluloses with steam explosion for production of seed and fuel ethanol. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2, Maringá, PR. Anais... Maringá, 1985. 1:235-264.
11. CHAVES, V.M.G. (1982) - Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, 1982. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
12. COONEY, D.G. & EMERSON, R. (1964) - Thermophilic Fungi: an account of their biology, activities and classification. San Francisco: W.H. Freeman, p. 72-87.
13. COWLING, E.B. & KIEK, T.K. (1976) - Properties of cellulose and lignocellulose materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology and Bioengineering Symposium. 6:95-123.
14. DEKKER, R.F.H. (1985) - The enzymatic hydrolysis of biomass. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2, Maringá. Anais.... Maringá, 1985. 1:55-92.
15. DEKKER, R.F.H. & RICHARDS, G.N. (1976) - Purification, properties and mode of action of Hemicellulase II produced by Ceratocystis paradoxa. Carbohydr. Res. 42:103-107.
16. DUFF, S.J.B., COOPER, D.G. & FULLER, D.M. (1986) - Evaluation of the hydrolytic potencial of a crude cellulase from mixed cultivation of T. reesei and A. phoenicis. Enzyme Microb. Technol. 8:305-308.
17. DURAND, H., SOUCAILLE, P. & TIRABY, G. (1984) - Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles Trichoderma reesei and Penicillium sp. and thermophiles Thielavia terrestris and Sparatrichum cellulophilum. Enzyme Microb. Technol. 6:175-180.

18. FONTANA, J.D., GEBARA, M., BLUMEL, M., SCHNEIDER, H., MACKENZIE, C.R. & JOHNSON, K.G. (1988) - α -4-O-Methyl-D-Glucuronidase Component of Xylanolytic Complexes. *Methods Enzymol.* 160:560-571.
19. GANJU, R.K., VITHAYATHIL, P.J. & MURTHY, S.K. (1989) - Purification and characterization of two xylanases from Chaetomium thermophile var. coprophile. *Can. J. Microbiol.* 35:836-842.
20. GOLDSTEIN, I.S. (1976) - Chemicals from Lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering Symposium.* 6:293-301.
21. GRUNINGER, H. & FIECHTER, A. (1986) - A novel, highly thermostable D-xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* 8:309-314.
22. GUERRA, M.J. & PARK, Y.K. (1975) - Extraction of sesame seed protein and determination of its molecular weight by SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52:73-75.
23. HAGERDAL, B., FERCHAK, J.D. & FYE, E.K. (1978) - Cellulolytic enzyme system of Thermoactinomyces sp grown on microcrystalline cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:606-612.
24. HAGERDAL, B., FERCHAK, J.D. & FYE, E.K. (1980) - Saccharification of cellulose by the cellulolytic enzyme system of Thermomonospora sp I. Stability of cellulolytic activities with respect to time, temperature and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 22:1515.
25. HALLIWELL, G. & GRIFFIN, M. (1973) - The nature and mode of action of the cellulolytic component C₁ of Trichoderma koningii on native cellulose. *Biochem. J.* 135:587.

26. HAYASHIDA, S. & YOSHIOKA, H. (1980) - The role of Carbohydrate moiety on thermostability of cellulases from Humicola isolens YH-8. Agric. Biol. Chem. 44:481-487.
27. HAYASHIDA, S. & YOSHIOKA, H. (1980) - Production and purification of Thermostable cellulases from Humicola isolens YH-8. Agric. Biol. Chem. 44:1721-1728,
28. HAYASHIDA, S. & MO, K. (1986) - Production and Characterizatics of avicel-desintegrating endoglucanase from a Protease-negative Humicola grisea var. thermoidea mutant. Appl. Environ. Microbiol. 51:1941-1046.
29. JOHN, M. & SCHMIDT, J. (1988) - Xylanases and -Xylosidase of Trichoderma Lignorum. Methods Enzymol. 160:662-671.
30. JOHNSON, K.G., HARRISON, B.A., SCHNEIDER, H., MACKENZIE, C.R. & FONTANA, J.D. - Xylan - hydrolysing enzymes from Streptomyces spp. Enzyme Microb. Technol. 10:403-409.
31. JURASEK, L. & PAICE, M.G. (1988a) - Biological bleaching of Pulp, P. 11-13. In: Salvo, T.I. (ed.) Internacional pulp. bleaching Conferense, Orlando, Flo.
32. JURASEK, L. & PAICE, M.G. (1988b) - Xilanase A of Schizophyllum commune. Methods in Enzymology 160:659-662.
33. KAJI, A., SATO, M. & TSUTSUI, Y. (1981) - An -L- Arabinofuranosidase produced by wild-type Streptomyces sp. N 17-1. Agric. Bio. Chem. 45:925-931.
34. KITPREECHAVANICH, V., HAYASHI, M. & NAGAI, S. (1984) - Purification and properties of endo 1,4-beta-xylanase from Humicola lanuginosa. J. Ferment. Technol. 62:415-420.
35. KOMAE, K., KASI, A. & SATO, M. (1982) - An -L- Arabinofuranosidase from Streptomyces purpuracens IFO 3389. Agric. Biol. Chem. 46:1899-1905.

36. KOMURA, I., AWAO, T. & YAMADA, K. (1978) - Thermostable cellulase and method for producing the same. US. Pat. 4.106.989.
37. KOSARIC, N., WIECZOREK, A., COSENTINO, G.P. & MAGEE, R.J. (1988) - Ethanol fermentation. In: Rehm, H.J. and Reed, G. (ed.) Biotechnology. A comprehensive treatise in 8 volumes. 3:257-385.
38. LACHKER, A.H. (1988) - 1,4- β -D-Xylan Xylohydrolase of Sclerotium rolfsi. Methods Enzymol. 160:679-684.
39. LEE, S.F. & FORSBERG, C.W. (1987) - Isolation and some properties of a β -D-Xylosidase from Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. 53:651-654.
40. LEE, S.F., FORSBERG, C.W. & RATTRAY, J.B. (1987) - Purification and Characterization of two endoxylanases from Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Appl. Environ. Microbiol. 53:644-650.
41. LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:267-275.
42. MAHESHWARI, R. & KAMALAN, P.T. (1985) - Isolation and culture of a thermophilic fungus, Melanocarpus albomyces and factors influencing the production and activity of xylanase. J. Gen. Microbiol. 131:3017-3027.
43. MANDELS, M., ANDREOTTI, R. & ROCHE, C. (1976) - Measurement of Saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6:21-33.
44. MANDELS, M. & STERNBERG, D. (1976) - Recent Advances in cellulase Technology. J. Ferment. Technol. 54:267-286.

45. MANDELS, M. (1982) - Cellulases. Annual Reports on Fermentation Process. 5:35-78.
46. MATSUO, M. & YASUI, T. (1988) - β -Xylosidases of several Fungi Methods Enzymol. 160:684-695.
47. MCCARTHY, A.J. & CROSS, T. (1984) - A taxonomic study of Thermonospora and other monoporic actinomycetes. J. Gen. Microbiol. 130:5-25.
48. MCCARTHY, A.J., PEACE, E. & BRODA, P. (1985) - Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21:238-244.
49. MIHRA, M.M., KAPOOR, K.K., JAIN, M.K. & SINGH, C.P. (1981) - Cellulose degradation by Humicola lanuginosa. Trans. Br. Mycol. Soc. 76:1159-160.
50. MISHRA, C. & RAD, M. (1985) - Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulytic activities of Penicillium funiculosum. Enzyme Microbiol. Technol. 7:295-299.
51. MILLER, G.L. (1959) - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428.
52. MONTI, R. (1989) - Produção de cellulases pelo fungo termófilo Humicola grisea var. thermoidea RP-17: Fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. Ribeirão Preto, 1989. Tese de Doutorado em Bioquímica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.
53. MONTI, R., TEREZI, H.F. & JORGE, J.A. (1991) - Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus Humicola grisea var. thermoidea. Can. J. Microb. 37:675-681.

54. MOREIRA, A.R., PHILIPS, J.A. & HUMPHREY, A.E. (1981) - Production of cellulases by Thermomonospora sp. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1339-1347.
55. NISIZAWA, K., TOMITA, Y., KANDA, T., SUZUKI, H. & WAKABAYASHI, K. (1972) - Substrate specificity of C₁ and C_x cellulase componentes from fungi. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today* 719-725.
56. MURAD, S., KANAMOTO, J. & ARAI, M (1979) - Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. *J. Ferment. Technol.* 57:151-156.
57. OKAZAKI, W., AKIBA, T., HORIKOSHI, K. & AKAHOSHI, R. (1984) - Production and properties of two types of xylanases from alkalophilic thermophilic Bacillus spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:335
58. OKAZAKI, W., AKIBA, T. & HORIKOSHI, K. (1985) - Purification and Characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic Bacillus sp. *Agric. Biol. Chem.* 49:2033-2039.
59. PAICE, W. & JURASEK, L. (1984) - Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. *J. Wood Chem. Technol.* 4:187-198.
60. PAICE, M.G., BERNIER JR., R. & JURASEK, L. (1988) - Viscosity Enhancing bleaching of Hardwood Kraft pulp with xylanase from a Cloned Gene. *Biotechnol. and Bioeng.* 32:235-239.
61. PULS, J., BORCHMANN, A., GOTTSCHALK, D. & WIEGEL, J. (1988) - Xilobiose and xylooligomers. *Methods in Enzymology*, 160:528-536.
62. QURESH, M.S.A., MIRZA, J.H. & MALIK, K.A. (1980) - Cellulolytic activity of some thermophilic and thermotolerant fungi of Pakistan. *Biologia* 26:200-217.

63. REESE, E.T., SIU, R.G.H. & LEVINSON, H.S. (1950) - The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hidrolise. *J. Bacteriol.* 59:485-497.
64. REESE, E.T. (1976) - History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. *Biotechnology and Bioengineering Symposium.* 6:9-20.
65. REESE, E.T. and MANDELS, M. (1980) - Stability of the cellulase of Trichoderma reesei under use conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 22:323.
66. RISTROPH, D.L. & HUMPHREY, A.E. (1985) - Kinetic Characterization of the extracellular xylanases of Thermonospora sp. *Biotechnol. Bioeng.* 27:832-836.
67. ROBERTS, J.C., MCCARTHY, A.J., NIGEL, J.F. & BRODA, P. (1990) - Modification of paper properties by pretreatment of pulp with Saccharomonospora viridis xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* 12:210-213.
68. ROSEMBERG, S.L. (1975) - Temperature and pH otima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. *Can. J. Microbiol.* 21:1535-1540.
69. ROY, S.K., RAHA, S.K., DEY, S.K. & CHAKRABARTY, S.L. (1989) - Immobilization of Beta-glucosidase from Myceliophthora thermophila D-14. *Enzyme Microb. Technol.* 11:431-435.
70. ROY, S.K., DEY, S.K., RAHA, S.K. & CHAKRABARTY, S.L. (1990) - Purification and properties of an extracellular endoglucanase from Myceliophthora thermophila D-14 (ATCC 48104). *J. Gen. Microbiol.* 136:1967-1971.
71. RYU, D.D. & MANDELS, M. (1980) - Cellulase, biossintesis and applications. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2:91-101.

72. SAKKA, K., MAEDA, Y., HAKAMADA, Y., TAKAHASHI, N. & SHIMADA, K. (1991) - Purification and some properties of xylanase from Clostridium stercorarium strain HX-1. Agric. Biol. Chem. 55:247-248.
73. SCOPES, R.K. (1987) - Protein Purification: Principles and Practice. 2.ed. New York, Springer, p.329.
74. SHAMALA, T.R. & SREEKANTIAH, K.R. (1986) - Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. Enzyme Microb. Technol. 8:178-182.
75. SHAMALA, T.R. & SREEKANTIAH, K.R. (1987) - Successive cultivation of selected cellulolytic fungi on rice straw and wheat Bran for economic productions of cellulases and D-xylanase. Enzyme Microb. Technol. 9:97-101.
76. SHINNER, W.A. & TOKUYAMA, F. (1978) - Production of cellulase by a thermophilic fungus Thielavia terrestris. U.S. Pat. 4 081 328.
77. SIMMONS, E.G. (1977) - Int. Mycol. Cong., 2, Tampa, Florida. Abstract... Tampa, Florida, August 1977, p. 618.
78. STEWART, J.C. & HEPTINSTALL, J. (1988) - Cellulase and Hemicellulase from Aspergillus fumigatus Fresenius. Meth. Enzymol. 160:264-273.
79. TAN, L.U.L., MAYERS, P. & SADDLER, J.N. (1987) - Purification and Characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus Thermoascus aurantiacus. Can. J. Microbiol. 33:689-692.
80. TAIZ, L. & HONIGMAN, W.A. (1976) - Production of cell wall Hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid. Plant Physiol. 58:380-386.

81. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.G. (1950) - Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature* 166:444-445.
82. VIIKARI, L., RANUA, M., KANTELINER, A., SUNDIQUIST, J. & LINKO, M. (1986) - in *Biotechnology in the pulp and paper industry*. P. 67. Swedish Forest products Laboratory, Stockholm, Sweden.
83. YASUI, T. & MATSUO, M. (1988) - α -Xylosidase/ β -Glucosidase of Chaetomium trilaterale. *Methods Enzymol.* 160 :696-700.
84. YOSHIOKA, H. & HAYASHIDA, S. (1980) - Purification and properties of beta-glucosidase from Humicola isolens YH-8. *Agric. Biol. Chem.* 44:1729-1735.
85. YOSHIOKA, H., NAGATO, N., CHAVANICH, S., NILUBOL, N. & HAYASHIDA, S. (1981) - Purification and properties of Thermostable xylanase from Talaromyces byssochlamydoides YH-50. *Agric. Biol. Chem.* 45:2425-2432.
86. YOSHIOKA, H., ANRAKU, S.I. & HAYASHIDA, S. (1982) - Production and Purification of a Novel type of CMCase from Humicola grisea var. thermoidea YH-78. *Agric. Biol. Chem.* 46:75-82.
87. YU, E.K.C., TAN, L.U.L., CHAN, M.K.H., DESCHATELETS, L. & SADDLER, J.N. (1987) - Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, Thermoascus aurantiacus. *Enzyme Microb. Technol.* 9:16-24.
88. WASE, D.A.J., RAYMAHASAY, S. & WANE, C.W. (1985) - Production of beta-D-glucosidase, endo-1,4-beta-D-glucanase and D-xylanase from straw by Aspergillus fumigatus IMI 255091 *Enzyme Microb. Technol.* 7:225-229.

89. WEBER, K. & OSBORN, M.J. (1969) - The reability of molecular weight determination by dodecyl sulphate - polyacrilamida gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406-4412.
90. WHISTLER, R.L. & RICHARDS, E.L. (1970) - in Figman, W. and HORTON, D. (eds.). The carbohydrates. Academic Press, New York. p. 447-469.
91. WOJTCZAK, G., BREUIL, C., YAMADA, J. & SADDLER, J.N. (1987) - A comparison of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:82-87.
92. WONG, K.Y., TAN, U.L. & SADDLER, J.N. (1986) - Purification of a Third distinct xylanase from the xylyanolytic system of Trichoderma hatzianum. Can. J. Microbiol. 32:570-576.
93. WONG, K.K.L.Y., TAN, L..U.L. & SADDLER, J.N. (1988) - Multiple city of -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications. Microbiol. Rev. 52:305-317.
94. WOOD, T.M. (1972) - The C₁ Component of the cellulase complex. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today. 711-718,
95. WOOD, T.M. & BHAT, M. (1988) - Methods for measuring cellulase activities. Methods enzymol. 160:87-112.
96. WOODWARD, J. (1984) - Xilanases: Functions, Properties and Applications. Top. Enzyme Ferment. Biotechnol. 8:9-30.