

ADRIANE MARIA FERREIRA MILAGRES n.º 589

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Penicillium janthinellum* E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS KRAFT

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências,
área de Bioquímica

Orientador

Prof^a Dr^a. Nora Marcela Haun Quirós *

Campinas, 1994

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Adriane Maria Ferreira
Milagres
e aprovada pela Comissão Julgadora.
L. M. A. C. V. G.

49 1025

Aos meus pais e irmãos.
Ao meu marido Áureo.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a Nora Marcela Haun Quirós, por ter-me aceito sob sua orientação.

Ao Professor Dr. Néilson Duran, que me ajudou a começar este trabalho e o acompanhou durante todas as suas etapas.

Aos Professores Dr^a Lúcia Regina Durrant, Dr^aLúcia Pereira da Silva e Dr.Hiroshi, Aoyama pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários do CEBIQ-FAENQUIL, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

Aos colegas de Curso, pela convivência agradável e divertida, especialmente à Angela e Regina.

Ao CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	ix
GLOSSÁRIO	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Componentes Estruturais da Madeira	3
2.2 Degradação Enzimática de Xilanas	10
2.3 Fatores que Influenciam a Produção de Xilanases por Microrganismos	22
2.4 Produção de Xilanase em Fermentadores	25
2.5 Aplicações Industriais de Xilanase	26
2.6 Branqueamento de Polpas de Celulose	27
2.6.1 Deslignificação com Microrganismos	30
2.6.2 Branqueamento em Sequências com Enzimas	30

Ligninolíticas	
2.6.3 Branqueamento com Xilanases	31
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Material	38
4.1.1 Microrganismo	38
4.1.2 Bagaço de Cana-de-Açúcar	38
4.1.3 Reagentes	38
4.1.4 Meios de Cultura	38
a) Meio de Manutenção dos Fungos	38
b) Meio Básico	39
c) Meio Formulado a Partir do Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-Açúcar	39
d) Meio para Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	40
4.1.5 Enzimas Utilizadas nos Ensaio de Branqueamento	41
4.2 Métodos	41
4.2.1 Avaliação das Atividades Enzimáticas	41
a) Xilanase(EC 3.2.1.8)	41
b) β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e β -glicosidase(EC 3.2.1.21)	42
c) Acetil Esterase(EC 3.1.1.6)	43
d) Celulases	43
e) Atividade em Papel de Filtro	44

f) Lignina Peroxidase	44
4.2.2 Determinação de Proteínas	44
4.2.3 Determinação dos Açúcares	45
4.2.4 Determinação da Concentração Celular	45
4.2.5 Fracionamento do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-Açúcar	46
4.2.6 Preparo do Inóculo	46
4.2.7 Condições de Cultivo para Produção de Xilanase em Incubadora de Movimento Rotatório	47
a) Determinação da Temperatura para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase	47
b) Determinação do pH para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase	47
c) Determinação da Agitação para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase	48
4.2.8 Condições de Cultivo para Produção de Xilanase em Fermentador	48
4.2.9 Condições de Cultivo para Produção de Lignina Peroxidase	48
4.2.10 Propriedades do Extrato Enzimático Bruto	49
a) Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Xilanase	49
b) Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Xilanase	49
4.2.11 Purificação de Uma Xilanase e Uma β-xilosidase	50
4.2.12 Estudos Eletroforéticos	53
a) Eletroforese em Condições Desnaturantes	53
b) Determinação do Ponto Isoelétrico	54

4.2.13 Estudo do Tempo de Hidrólise	54
4.2.14 Polpa	55
a) Determinação de Lignina, Celulose e Hemicelulose das Polpas	55
b) Tratamento Enzimático das Polpas	56
4.2.15 Otimização da Etapa Enzimática do Branqueamento	56
4.2.16 Reflectância Difusa de Infravermelho com Transformada de Fourier	58
4.2.17 Experimentos de Branqueamento	60
4.2.18 Controle dos Processos de Branqueamento	61
a) Determinação do Número Kappa	62
b) Determinação da Viscosidade	64
c) Determinação da Alvura	64
d) Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 Produção de Xilanases e Celulases em Diferentes Fontes Polissacarídicas	66
5.2 Comportamento de Crescimento e Produção de Xilanases de <i>P. janthinellum</i> Cultivado em Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-Açúcar	71
5.2.1 Efeito da Temperatura e pH	71
5.2.2 Efeito da Agitação	74
5.2.3 Produção em Fermentador	76
5.3 Propriedades do Extrato Enzimático Bruto	77
5.3.1 Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade	77

da Xilanase	
5.3.2 Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Xilanase	81
5.4 Purificação de Uma Xilanase e Uma β -xilosidase	84
5.5 Estudos de Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto por Enzimas	95
5.5.1 Otimização da Etapa Enzimática do Branqueamento da Polpa Kraft de Eucalipto	95
5.5.2 Reflectância Difusa de Infravermelho com Transformada de Fourier	99
5.5.3 Tratamento de Polpas com Xilanases Comerciais e de <i>Penicillium janthinellum</i> (Penjanzyme)	102
5.5.4 Redução de Produtos Clorados Durante o Branqueamento	105
6.CONCLUSÕES	116
7.PERSPECTIVAS	119
8. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE	120
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
10.APÊNDICES	142

ABREVIATURAS

AOX	Halogênio orgânico adsorvido
C	Cloração
CA	Cloro Ativo
CM-celulose	Carboximetilcelulose
COT	Carbono orgânico total
D	Dióxido de cloro
Da	Dalton
DEAE	Dietilaminoetil
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
E	Extração alcalina
Ep	Extração alcalina com peróxido
Eo	Extração alcalina com oxigênio
FPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência para proteínas
GP	Grau de polimerização
H	Hipocloração
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K	Taxa de inativação da enzima pela temperatura
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Ligninases
O	Oxigênio
P	Peróxido de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
pNP	p-Nitrofenol

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
t_{1/2}	Meia-vida de uma reação
U	Unidades enzimáticas (μmol/min)
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
X₁, X₂, X₃	Xilose, Xilobiose, Xilotriose.
X	Xilanase

GLOSSÁRIO

AOX - É uma técnica que mede a quantidade de cloro ligado covalentemente a compostos orgânicos. A formação de AOX pode ser estimada pelas quantidades de cloro e dióxido de cloro usadas no branqueamento.

%ISO - Forma de representar os resultados de alvura em porcentagem da alvura do óxido de magnésio (MgO), considerado igual a 100.

Número Kappa - Medida do teor de lignina residual da polpa. É o número de mililitros de uma solução de KMnO_4 0,1 N consumida por 1 g de celulose seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de permanganato em contato com o corpo de prova.

Madeira mole ou "softwood" - Lenho produzido pelas árvores coníferas

Madeira dura ou "hardwood" - Madeira produzida por dicotiledôneas lenhosas

Teste t - método estatístico que indica se há diferença apreciável entre médias de dois conjuntos de resultados

RESUMO

Neste estudo investigou-se a possibilidade de utilização de um hidrolisado hemicelulósico, obtido a partir da hidrólise ácida branda do bagaço de cana-de-açúcar, como meio de cultura para crescimento do fungo *Penicillium janthinellum* e para produção de xilanases. As condições ótimas para crescimento do fungo e produção de xilanases em incubadora com movimento rotatório foram: temperatura de 30 °C, pH inicial entre 5,0 e 6,0 e agitação de 60 rpm. Sob essas condições, o crescimento celular esteve associado à síntese das enzimas em estudo. Em comparação à xilanase, os níveis de indução das enzimas β -xilosidases, β -glucosidases, endoglucanases e exoglucanases foram pequenos.

A produção de xilanases foi também realizada em fermentador de 4 L agitado mecanicamente em meio à base de hidrolisado hemicelulósico, tendo a atividade das xilanases assim produzidas se mostrado menor que a das obtidas em incubadora com movimento rotatório.

Uma endoxilanase e uma β -xilosidase foram purificadas do fluido de cultivo do fungo. O estudo da influência do pH revelou um pH ótimo de 5,5 para a atividade da endoxilanase e de 6,0 para a β -xilosidase. Os valores ótimos de temperatura foram 50 °C e 60 °C para endoxilanase e β -xilosidase, respectivamente.

Os principais produtos da hidrólise de xilana pela endoxilanase foram xilose, xilobiase e xilotriose. Os pesos moleculares da endoxilanase e β -xilosidase, determinados por SDS-PAGE, foram 54 kDa e 74,3 kDa, respectivamente. A endoxilanase apresentou uma atividade específica de 1300 U/mg de proteína e a β -xilosidase, uma atividade de 34,1 U/mg de proteína.

No presente trabalho também foram estudados métodos para branquear polpa kraft de eucalipto, utilizando-se xilanases ou ligninases. Para se chegar à otimização das

principais variáveis que tinham algum efeito na eficiência da deslignificação de polpas por xilanases, foram necessários dezesseis ensaios sob duas combinações de temperatura, pH, concentração de enzima e tempo de incubação, empregando o método de planejamento fatorial. O melhor resultado - redução de 26% do número Kappa - foi alcançado através do ensaio em que se utilizaram 10 U de xilanase /g de polpa a 40°C, pH 5,5 e 180 minutos de incubação. Em todos os ensaios o pH foi a única variável que apresentou um efeito significativo quando alterada.

A fim de se obter a redução do cloro sem prejudicar a qualidade da polpa, foram desenvolvidas as seguintes sequências com adição de xilanase (X) e ligninase (L): XCED, XCEHD, XC(EP)HD, XC(EO)HD, LCEHD, LC(EP)HD, XOP(EOP)DP.

Na sequência XCED a substituição total de cloro por enzima no primeiro estágio proporcionou uma redução do número Kappa e um aumento paralelo da viscosidade. A polpa tratada com a sequência XCEHD foi a que apresentou maior alvura (88,9%), com 25% a menos de cloro molecular. O acréscimo de peróxido de hidrogênio ou oxigênio a essa sequência acarretou uma maior redução do número Kappa. A máxima alvura obtida com a sequência LC(EP)HD foi de 81,2%, praticamente o mesmo valor alcançado na sequência controle CEHD. Na sequência LCEHD a alvura foi de 75,3%.

Na parte final deste trabalho fez-se a avaliação do uso de sequências curtas com oxigênio no branqueamento de polpa kraft de eucalipto. A polpa, inicialmente tratada com xilanases e deslignificada com oxigênio, foi posteriormente branqueada por tratamento convencional com dióxido de cloro (D) e um tratamento livre de reagentes à base de cloro, feito com peróxido de hidrogênio. A sequência XOP(EOP)DP levou a uma deslignificação de 34,6% e a sequência OXP(EOP)DP, a uma deslignificação de 38,5%. Na ausência da enzima, a deslignificação só chegou a 32,6%.

SUMMARY

This work investigates the possibility of utilizing a hemicellulosic hydrolysate obtained from mild acid hydrolysis of sugar cane bagasse as a culture medium for growing the fungus *Penicillium janthinellum* and for producing xylanases.

The optimum conditions for the growth of fungus and the production of xylanases in a rotary incubator were: temperature of 30°C, initial pH between 5.0 and 6.0 and agitation at 60 rpm. Under these conditions, cell growth was associated with the synthesis of the enzymes being studied. When compared to xylanase, the induction levels of the enzymes β -xylosidases, β -glucosidases, endoglucanases and exoglucanases were small.

Xylanase production was also carried out in a 4 L mechanically agitated fermentor, using a hemicellulosic hydrolysate-based medium. The activity of the xylanases produced in this manner was lower than that of the xylanases produced in the rotary incubator.

An endoxylanase and a β -xylosidase were purified from the culture filtrate of the fungus. The study of the pH influence revealed an optimum pH of 5.5 for endoxylanase activity and of 6.0 for β -xylosidase. The optimum values of temperature were 50°C and 60°C for endoxylanase and β -xylosidase, respectively.

The main products of xylan hydrolysis by endoxylanase were xylose, xylobiose and xylotriose. The molecular weight values, determined by SDS-gel electrophoresis was 54 kDa, whereas the molecular weight of the β -xylosidase was 74,3 kDa. The endoxylanase showed a specific activity of 1,300 U/mg of protein and the β -xylosidase, an activity of 34.1 U/mg of protein.

Methods for bleaching eucalyptus kraft pulp utilizing xylanases or ligninases were also studied. In order to optimize the main variables that had some effect on the efficiency of the pulp delignification by xylanases, it was necessary to carry out sixteen runs under two combinations of temperature, pH, enzyme concentration and incubation time according to the factorial method for experimental design. The best result - a 26%

reduction in kappa number was obtained through an experiment using 10 U of xylanase/g of pulp at 40°C, pH 5.5 and incubation for 180 minutes. In all tests the pH was the only variable that presented significant effect when changed.

To reduce the chlorine without effecting the quality of the pulp, the following sequences were developed with addition of xylanase (X) and ligninase (L): XCED, XCEHD, XC(EP)HD, XC(EO)HD, LCEHD, LC(EP)HD, XOP(EOP)DP.

In the sequence XCED the total replacement of enzyme by chlorine in the first stage caused some reduction in kappa number and a parallel enhancement of viscosity. The pulp treated with the sequence XCEHD showed the greatest brightness (88.9%) with 25% less chlorine. The addition of hydrogen peroxide or oxygen to this sequence brought about a bigger reduction in kappa number. The maximum brightness achieved with the sequence LC(EP)HD was 81.2%, practically the same value achieved with the control-sequence CEHD. In the sequence LCEHD brightness reached 75.3%.

The last part of this study showed an evaluation of the use of short sequences with oxygen for bleaching eucalyptus kraft pulp. The pulp, initially treated with xylanases and delignified oxygen, was bleached with chlorine dioxide (D) and another treatment free chlorine-based reagents using hydrogen peroxide. The sequences XOP(EOP)DP and OXP(EOP)DP led to 34.6% and 38.5% delignifications, respectively. A 32.6% delignification was obtained in the absence of the enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de Arranjo Estrutural de Celulose, Hemicelulose e Lignina na Parede Celular. Modelo de Distribuição da Celulose, Hemicelulose, Lignina e Hemicelulose na Parede Celular (A); Corte Ilustrativo de Camadas na Parede das Células de Madeira (B)	4
2	Estrutura Genérica de um Fragmento de Celulose	5
3	Estrutura dos Precursores da Lignina. (I) álcool-p-hidroxi cumarílico; (II) álcool coniferílico (unidade guaiacil) e (III) álcool sinapílico (unidade siringil)	6
4	Estrutura Possível para a Lignina Proposta por E. Adler (FENGEL & WEGENER, 1989)	7
5	Estruturas de Hemiceluloses Comumente Encontradas em Algumas Espécies de Madeira	9
6	Estrutura Hipotética de Xilana e os Pontos de Hidrólise por Enzimas Xilanólíticas. Ac, Grupo Acetil; Araf, L-arabinofuranosídeo; Me Glc, Ácido 4-O-metil-D-glucurônico; Xil, D-xilose	11
7	Estrutura de Um Ácido Ferúlico (A) e de Um Ácido Cumárico (B)	12
8	Esquema Proposto por VIIKARI (1991) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft	32
9	Esquema Proposto por PAICE <i>et alii</i> (1992) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft	33
10	Fluxograma de Purificação de Uma Xilanase e Uma β -Xilosidase de <i>P. janthinellum</i>	51
11	Perfil de Eluição de Hidrolisado Hemicelulósico em Sephadex G-10	70
12	Varição da Atividade de Xilanase (■) e do Crescimento Celular (□)	72

	com a Temperatura, Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar	
13	Variação da Atividade de Xilanase (■) e do Crescimento Celular (□) com o pH, Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de Açúcar	73
14	Variação da Atividade de Xilanase (■) e do Crescimento Celular (□) com a Agitação Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar	75
15	Efeito da Temperatura de Reação na Atividade de Xilanases de <i>P. janthinellum</i>	78
16	Efeito da Temperatura na Estabilidade de Xilanases (A), β -Xilosidase (B) e Acetil Esterase (C) de <i>P. janthinellum</i>	79
17	Efeito do pH na Atividade de Xilanases de <i>P. janthinellum</i>	82
18	Efeito do pH na Atividade (□) e Estabilidade de Xilanases (■) de <i>P. janthinellum</i>	83
19	Filtração Géllica em Coluna Sephacryl 300S	85
20	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Coletadas no Passo de Purificação de Uma β -Xilosidase de <i>P. janthinellum</i>	86
21	Curvas de Titulação das Proteínas Presentes no Extrato Enzimático de <i>P. janthinellum</i>	87
22	Cromatografia de Troca Iônica em DEAE Sephadex A-50	88
23	Cromatografia em FPLC da Fração que Não se Ligou à Coluna de Troca Iônica	89
24	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Coletadas nos Passos de Purificação de Uma Xilanase de <i>P. janthinellum</i>	93
25	Espectros de Infra-Vermelho de Polpas Kraft Tratadas com NaOH 4% (A) e de Polpas Tratadas com Xilanases e NaOH 4% (B)	100

26	Efeito da Concentração de Cloro e de Xilanase na Alvura de Polpas Kraft Submetidas à Sequência CED	107
1A	Análise dos Açúcares Presente nas Fações I (A), II (B), III (C) do Hidrolisado de Bagaço, Determinados por HPLC	138
2A	Esquema de Montagem do Fermentador para Síntese de Xilanase por <i>P. janthinellum</i> a Partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar	139

LISTA DE TABELAS

Tabela		
1	Principais Componentes da Madeira	4
2	Características de Endo-(1,4)- β -D-Xilanases Isoladas de Microrganismos	15
3	Características de β -Xilosidases Isoladas de Microrganismos	18
4	Valores Reais e Codificados Atribuídos às Variáveis	57
5	Matriz Especificando as Condições Experimentais de Todos os Ensaios Executados para o Planejamento Fatorial	58
6	Condições Gerais de Branqueamento	62
7	Atividade de Xilanases e Celulases Obtida em 96 horas de Cultivo de <i>P. janthinellum</i> em Fontes Polissacarídicas	67
8	Atividade de Xilanases e Celulases Obtida em Cultivo em Fermentador	76
9	Valores de Meia-Vida Obtidos das Curvas de Estabilidade Térmica de Xilanases, β -Xilosidases e Acetil-Esterases	80
10	Purificação de Uma Xilanase	90
11	Características Físico-Químicas e Cinéticas da Xilanase e da β -Xilosidase Purificadas do Cultivo de <i>P. janthinellum</i>	91
12	Composição dos Açúcares Solúveis(μ g/mL) Liberados da Hidrólise de Xilana por Uma Xilanase Purificada de <i>P. janthinellum</i>	94
13	Otimização de Condições de Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto Utilizando Sequências Curtas (XE)	96
14	Efeito Estimado de Um Projeto Fatorial 2^4	98
15	Absorbâncias das Bandas Características do Anel Glicosídico da Celulose (A898) e do Anel Aromático da Lignina (A1430) e (A1605)	101

de Polpas de Celulose Submetidas à Sequência XE		
16	Determinação da Atividade Xilanásica de Enzimas de Diferentes Procedências	103
17	Pré-Branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto Utilizando Xilanasas (1 U/g), Seguida por Extração Alcalina (XE)	104
18	Pré-Branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto Utilizando Xilanasas (10 U/g) Seguida por Extração Alcalina (XE)	104
19	Semi-Branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto em Concentrações Decrescentes de Cloro Gasoso (Cl₂)	106
20	Efeito de Xilanasas na Deslignificação da Polpa Kraft Utilizando 25% a Menos de Cloro Molecular	109
21	Efeito de Ligninasas na Deslignificação da Polpa Kraft Utilizando 25% a Menos de Cloro Molecular	111
22	Efeito de Xilanasas e Ligninasas na Deslignificação de Polpa Kraft	112
23	Características das Polpas Kraft Convencional e Pré-Branqueadas com Oxigênio Tratadas com Penjanzyme e Asperzyme	113
24	Efeito do Pré-Branqueamento de Polpa Kraft com Xilanasas em Sequências com Oxigênio e Ausentes de Cloro Gasoso	115
1A	Fator F para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato	140
2A	Fator para Correção da Temperatura	140

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico do mundo atual, e particularmente da indústria química, teve também a consequência adversa da poluição ambiental. Paralelamente, o alto consumo energético nas indústrias incrementa o aumento dos preços dos produtos. É neste contexto que se insere o desenvolvimento de uma tecnologia menos poluente e de custo energético comparativamente mais baixo, que tem o uso das enzimas como um dos seus objetivos principais. Atualmente a maioria das enzimas são de origem microbiana. Isto deve-se à maior diversidade de enzimas disponíveis a partir de microrganismos e também aos custos e inconveniência de se extrair enzimas de tecidos animais e vegetais.

O Brasil por suas características climáticas tem a capacidade de produzir recursos renováveis (biomassa) em grande escala. Em termos de produção e uso de enzimas, existe abundância de matéria prima a ser utilizada nos processos fermentativos de produção de enzimas, e também existe uma variedade enorme de biomassa a ser transformada por via tecnológica enzimática em produtos úteis e de maior valor agregado. É, então, premente o desenvolvimento de tecnologias para utilização destas fontes de matéria prima no país, evitando-se assim a evasão de divisas e a importação de tecnologias estrangeiras.

Hoje, a indústria de celulose e papel é uma das que vem buscando soluções para seus problemas através da tecnologia enzimática. Embora a indústria papeleira seja conservadora e estática, utilizando os mesmos processos há quase 100 anos, nos últimos 20 anos ela retomou seu desenvolvimento tecnológico em consequência dos problemas ambientais causados pelo uso excessivo de cloro.

O setor de celulose e papel é um dos mais importantes na indústria brasileira, tendo lugar de destaque no cenário internacional, em função da qualidade e da quantidade de polpa kraft branqueada de *Eucalyptus* spp. que se exporta. Entretanto, a indústria de celulose tem sido também rotulada como uma das mais poluidoras dentre as indústrias de manufaturados do país.

A planta de branqueamento da polpa tem sido considerada uma das principais fontes de poluição de uma fábrica de celulose kraft. Por isso, várias modificações tecnológicas tem sido sugeridas nessa etapa do processo.

A utilização de enzimas na indústria de celulose e papel em substituição a uma metodologia tradicional começou a ser estudada na década de 80. As xilanases são as enzimas mais estudadas para aplicação na etapa de branqueamento de polpas de celulose. Muitas xilanases têm sido isoladas e caracterizadas, contudo pouco se sabe da atuação do complexo em substratos insolúveis, como em polpas kraft. As condições do processo e a matéria prima definirão os tipos de enzimas e as condições para sua melhor atuação.

Dentro deste contexto este trabalho teve como objetivo avaliar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como meio de produção de xilanases por *Penicillium janthinellum*, em fermentação submersa, assim como purificar parcialmente o complexo xilanolítico produzido. Fez parte ainda deste estudo o estabelecimento de condições para aplicação das xilanases em sequências de branqueamento de polpas de eucalipto, produzidas pelo processo kraft.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Componentes Estruturais da Madeira

Dentre os materiais lignocelulósicos, a madeira é a matéria prima mais utilizada pelas indústrias de celulose e papel. É constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina em proporções que variam de 40 a 50%, 15 a 30% e 10 a 30%, respectivamente (DEKKER, 1985). Todos esses constituintes estão intimamente associados e/ou quimicamente ligados entre si e aos vários componentes não estruturais. Esses componentes não estruturais são na maioria extrativos orgânicos (fenóis, terpenos alcalóides, gorduras, esteróides, etc) (Tabela 1).

De uma maneira geral as madeiras são classificadas em dois tipos: madeiras moles ("softwood") e madeiras duras ("hardwood"). Madeiras moles são obtidas de plantas coníferas (gimnospermas) e madeiras duras, de plantas folhosas (angiospermas). A estrutura e a composição química da lignina e da hemicelulose diferem entre elas (FENGEL & WEGENER, 1989).

A Figura 1 ilustra a ultraestrutura de uma parede celular de madeira. Quanto à distribuição dos componentes pode-se dizer que na parede secundária, as fibrilas de celulose são orientadas de forma paralela, e são preenchidas por uma matriz de hemicelulose e lignina. Aproximadamente 80% do peso da célula é atribuído à parede celular secundária. A lamela média é constituída quase que totalmente por lignina, mas em relação à parede celular apenas 10 a 15% da lignina está localizada nesta camada.(FENGEL & WEGENER, 1989).

TABELA 1: Principais Componentes da Madeira

Componente (%)	Madeira Mole	Madeira Dura
Celulose	41,0	42,3
Hemicelulose		
Hexanas	19,0	5,6
Pentosanas	5,8	23,7
Lignina	28,0	20,8
Acetil	1,4	3,9
Outros	4,8	3,5

Fonte : OSHIMA, M., 1965

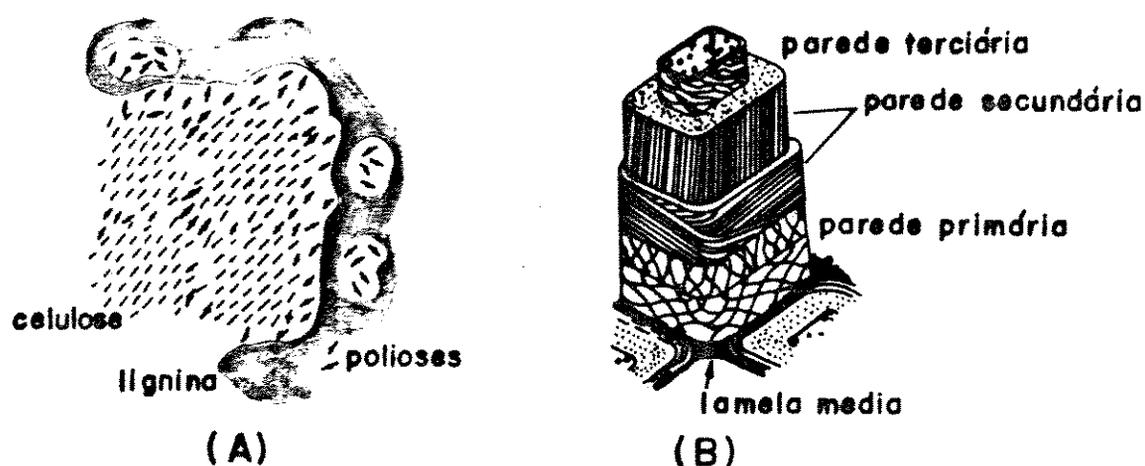


FIGURA 1. Esquema de Arranjo Estrutural de Celulose, Hemicelulose e Lignina na Parede Celular. Modelo de distribuição da celulose, lignina e hemicelulose na parede celular (A); Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células de madeira (B).

Celulose

É o maior componente da madeira, sendo um polímero linear formado exclusivamente por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). A celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose seguida da eliminação de água através das hidroxilas ligadas ao carbono 1 e 4 (Figura 2) (FENGEL & WEGENER, 1989).

O peso molecular mínimo da celulose, a partir de fontes diversas, foi estimado na faixa de 15 mil a 2,5 milhões nos diferentes materiais, apresentando um grau de polimerização entre 300 a 15000. A análise de difração de raio x indica que as moléculas de celulose estão organizadas em feixes de cadeias paralelas formando fibrilas (HARADA & CÔTÉ, 1985).

As cadeias de celulose são longas e as fibrilas estão densamente empacotadas. No estado sólido, existem pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose que levam a formação de estruturas supramoleculares arranjadas em um sistema ordenado parecidas às de cristais. No entanto, certa porção de celulose apresenta-se em forma de cadeias interligadas de maneira caótica formando a celulose amorfa (FENGEL & WEGENER, 1989).

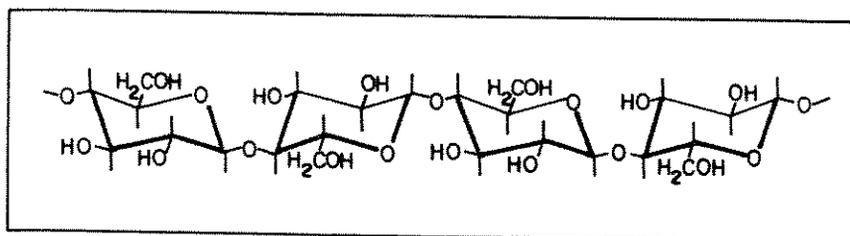


FIGURA 2. Estrutura Genérica de um Fragmento de Celulose.

Lignina

A lignina é um polímero tridimensional, de estrutura não uniforme e de peso molecular elevado, composto basicamente de unidades fenil propano. Os precursores da biossíntese da lignina são os álcoois sinapílico, coniferílico e para-cumarílico (Figura 3).

A proporção relativa dos precursores determina o tipo de lignina. As ligninas de madeira são divididas em dois grupos: ligninas guaiacil e ligninas guaiacil-siringil. As ligninas guaiacil são polímeros de álcool coniferílico, encontradas predominantemente em madeira mole. Ligninas de madeira duras são constituídas principalmente de unidades guaiacil e siringil que correspondem aos copolímeros dos álcoois sinapílico e coniferílico, respectivamente (HARADA & COTÉ, 1985). Vários tipos de ligações são formadas o que origina uma estrutura tridimensional complexa (Figura 4) (KANTELINEN, 1992).

A distribuição da lignina na parede celular varia de acordo com a espécie da madeira. O conteúdo da lignina é maior na lamela média, que conecta as fibras da madeira. Madeiras moles contém 26-32% de lignina e madeiras duras 20-28% (FENGEL & WEGENER, 1989).

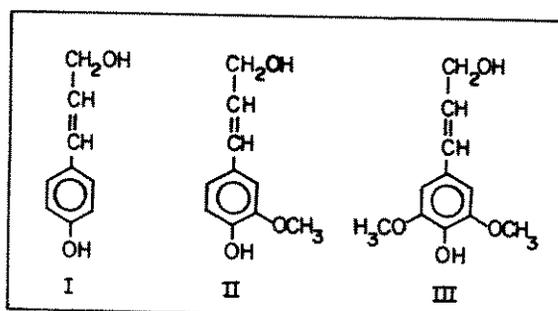


FIGURA 3. Estrutura dos Precursores da Lignina. (I) álcool p-hidroxi cumarílico; (II) álcool coniferílico (unidade guaiacil) e (III) álcool sinapílico (unidade siringil)

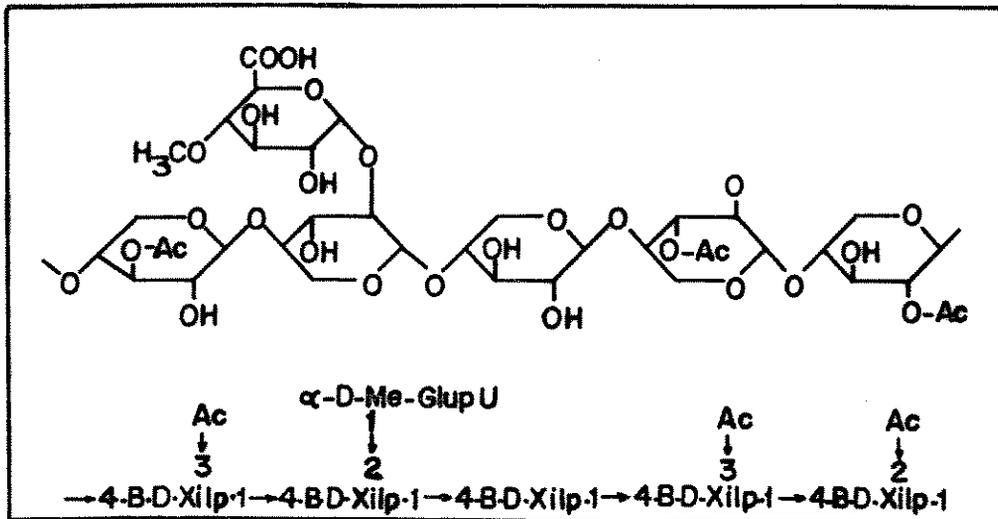
Hemiceluloses

As hemiceluloses consistem de uma mistura de polissacarídeos não celulósicos de baixo peso molecular, geralmente localizados no meio da lamela média das plantas, em toda a extensão da fibra, intimamente associados à celulose (JANES, 1969; WOODWARD, 1984; DEKKER, 1985). Em seu estado natural as hemiceluloses não são cristalinas em razão da heterogeneidade de seus constituintes, da presença de pequenos grupos laterais e em alguns casos ramificações, diferentemente da estrutura altamente linear das moléculas de celulose (JANES, 1969).

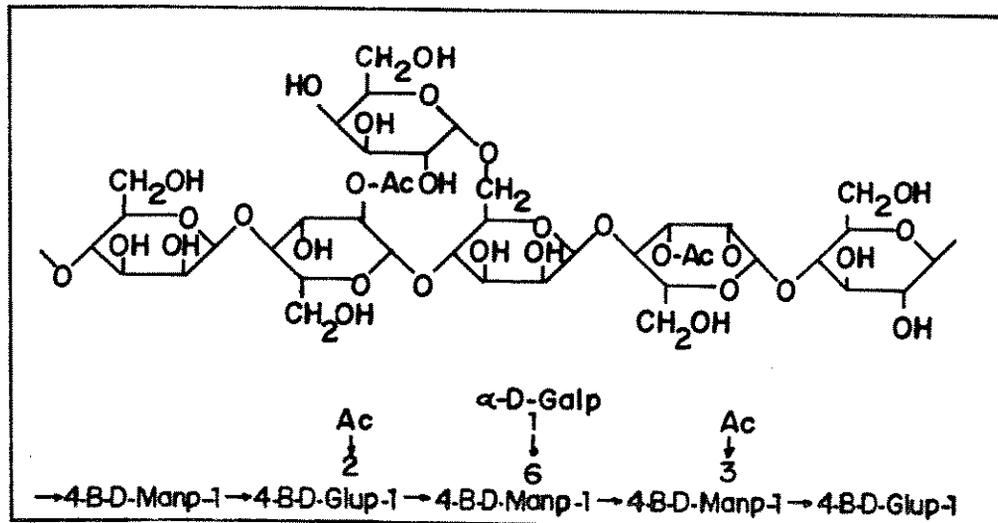
O conteúdo de hemiceluloses em plantas varia de 20 a 30% em base seca (THOMPSON, 1983). São compostas normalmente de 2 a 6 açúcares diferentes com um grau de polimerização de aproximadamente 200 e um peso molecular em torno de 20000 (BASTAWDE, 1992). A grande maioria apresenta ligações β (1,4) entre os seus constituintes, exceto as que possuem galactose, cuja ligação é do tipo β (1,3) (MAGEE & KOSARIC, 1985). Os açúcares que compõem as hemiceluloses são a D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e seus derivados acetilados ou metilados (JANES, 1969).

Por conveniência, as hemiceluloses podem ser empiricamente classificadas como glucanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (THOMPSON, 1983). As hemiceluloses presentes em madeira mole contém maiores proporções de manose e galactose, enquanto que as hemiceluloses de madeira dura são constituídas, principalmente, de xilose e grupos acetil (Figura 5).

A hemicelulose predominante em madeira dura é a O-acetil-(4-O-metilglucuronoxilana) acompanhada por pequenas proporções de glucomanana. No caso de madeiras moles há a predominância de várias estruturas de mananas (TIMELL, 1965; JANES, 1969).



O acetil-4-O-metilglucuronoxilana (madeira dura)



O acetil galacto glucomanana (madeira mole)

FIGURA 5. Estruturas de Hemiceluloses Comumente Encontradas em Algumas Espécies de Madeira .

As **glucuronoxilanas** consistem de um polímero de xilana com no máximo setenta resíduos de xilose e poucos grupos laterais de ácido glucurônico metilado. O ácido metil glucurônico se liga à posição 2 ou 3 da xilose por ligações do tipo alfa. Esta ligação é resistente à hidrólise por ácidos (JANES, 1969). O grau de polimerização das glucuronoxilanas varia de 100 a 300 e os grupos acetil representam de 3 a 5% do peso da madeira (WOODWARD, 1984).

As xilanas de madeiras moles são exemplos mais complexos. Ácidos urônicos estão presentes, como nas madeiras duras, mas diferentes unidades L-arabinofuranosídicas estão ligadas à cadeia principal, por ligações glicosídicas do tipo alfa, em vez de grupos acetil (THOMPSON, 1983; WOODWARD, 1984; DEKKER, 1985). A estrutura mais ramificada destes polímeros torna-os mais solúveis após o isolamento (POUTANEN *et alii*, 1989).

A **arabino(4-O-metilglucurono)xilana** é um polímero constituído por unidades repetitivas de 13 resíduos de β -D-xilopiranosídicos em que 3 resíduos de ácido 4-O-metil α -D-glucurônico ligam-se às posições 1, 2 da xilose e um resíduo de L-arabinofuranose nas posições 1, 3 (JANES, 1969; WOODWARD, 1984).

As **galactoglucomananas** são polímeros possuindo manose e glicose na cadeia, com grupos laterais de galactose, no caso de madeiras duras. A relação entre glicose e manose varia de 1:1 a 1:4 e o grau de polimerização é de aproximadamente 100 (JANES, 1969).

2.2 Degradação Enzimática de Xilanas

O sistema enzimático necessário para degradação de xilanas consiste de uma mistura de endo e exo enzimas (Figura 6). A estrutura da hemicelulose determina a

composição do sistema xilanolítico necessário para sua total hidrólise (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

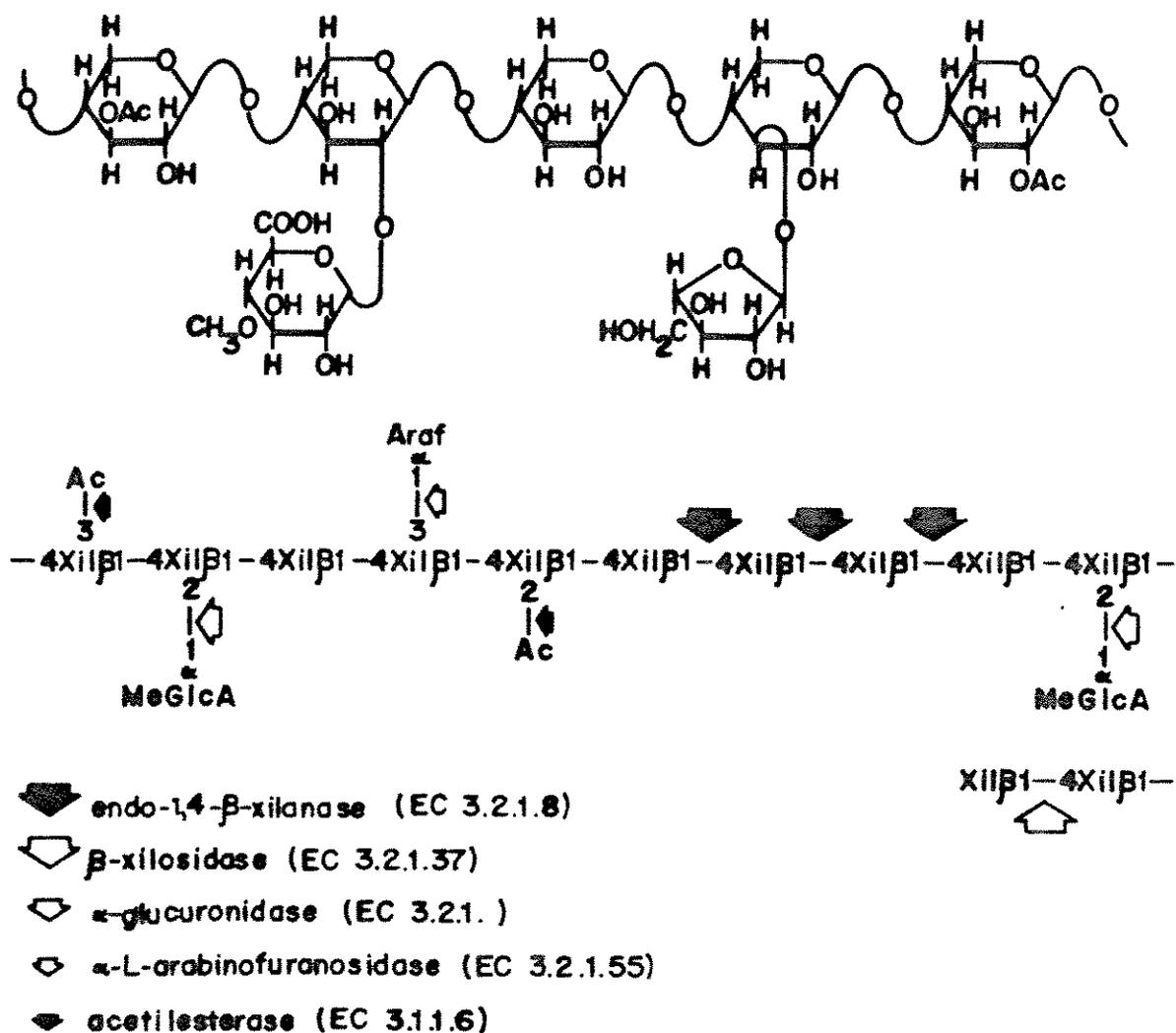


FIGURA 6: Estrutura Hipotética de Xilana e os Pontos de Hidrólise por Enzimas Xilanolíticas. Ac, Grupo Acetil; Araf, L-arabinofuranosideo; MeGlcA, Ácido 4-O-metil-D-glucurônico; Xil, D-xilose.

Endo-enzimas, como as endo-(1,4)- β -D-xilanases, hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) dentro da cadeia de hemicelulose. Oligossacarídeos liberados desta hidrólise podem ser degradados por β -xilosidases. Exo-enzimas, do tipo α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases e acetil(xilana)esterases, removem do polímero os substituintes arabinofuranosil, ácido glucopiranosídico e os grupos acetil, respectivamente (BIELY, 1985). Tem sido também descrito que algumas endo-xilanases podem clivar substituintes α -L-arabinofuranosídicos (DEKKER & RICHARDS, 1976; WONG *et alii*, 1988).

As xilanas "in situ" parecem estar ligadas intra e intermolecularmente a ácidos ferúlicos e cumáricos (Figura 7). Estes dois ácidos participam da biossíntese de lignina e estão presentes em diversos tipos de madeiras, esterificados aos resíduos de arabinose. Portanto a desintegração da parede celular requer ainda o uso de dois tipos de esterases, ferúlico esterase e cumárico esterase (KATO & NEVINS, 1985; SMITH *et alii*, 1991; TENKANEN *et alii*, 1992).

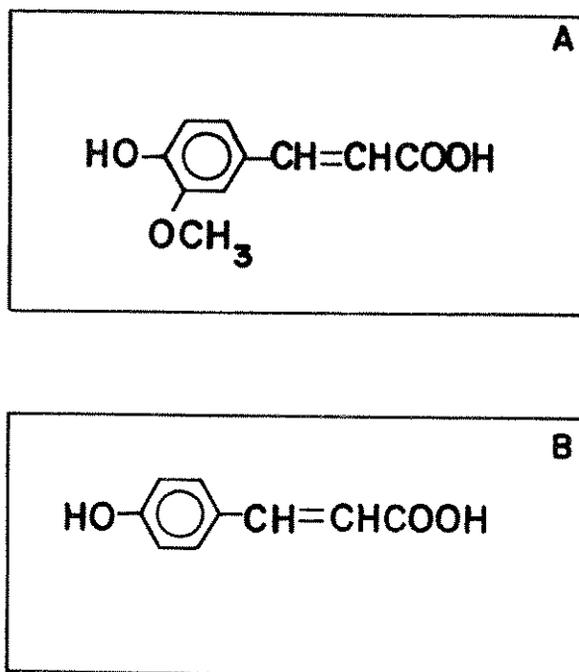


FIGURA 7. Estrutura de um Ácido Ferúlico (A) e de um Ácido Cumárico (B)

Endo-(1,4)- β -xilanases

Endo-(1,4)- β -xilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de xilana. Elas rompem a cadeia de xilana ao acaso produzindo xilo-oligossacarídeos com um baixo grau de polimerização. As características da enzima, modo de ação e os produtos de hidrólise variam de acordo com a sua origem (BASTAWDE, 1992).

As endo-xilanases podem ser classificadas de diferentes formas:

- Quanto aos produtos formados:

Existem duas formas de classificar as xilanases no que diz respeito aos produtos formados. DEKKER & RICHARDS (1976), subdividiram as endo-xilanases em dois grupos, as que não liberam arabinose de arabinoxilanas e arabinogalacturanoxilanas, e aquelas que liberam L-arabinose destes substratos.

Por outro lado, REILLY (1981), subdividiu todas as endo-xilanases em quatro tipos. Dois tipos foram capazes de hidrolisar pontos de ramificação, mas diferiram nos produtos finais formados. A primeira produziu xilobiose e xilose e a segunda produziu xilo-oligossacarídeos de tamanho intermediário. Os outros dois tipos não foram capazes de hidrolisar ramificações. Uma delas produziu xilo-oligossacarídeos maiores que xilobiose e a outra produziu principalmente xilobiose e xilose.

- Quanto a natureza do substrato

Uma outra classificação poderia ser feita de acordo com a habilidade das endo-xilanases em degradar xilana insolúvel ou solúvel. Duas endo-xilanases de *Aspergillus niger* hidrolisaram mais rapidamente xilana solúvel que a insolúvel (FREDERICK *et alii*, 1985). Uma terceira endo-xilanase do mesmo microrganismo hidrolisou xilana insolúvel

apenas quando as ramificações arabinofuranosídicas, presentes no substrato, foram previamente removidas (FOURNIER *et alii*, 1985).

Duas endo-xilanases de *Trichoderma reesei* apresentaram maior atividade com xilana insolúvel (LAPPALAINEN, 1986). Da mesma forma as endo-xilanases isoladas de *Clostridium stercorarium* hidrolisaram rapidamente xilana insolúvel (BERENGER *et alii*, 1985; SAKKA *et alii*, 1991).

Outros exemplos relacionam a maior eficiência de hidrólise de xilanase ao tamanho do substrato. Uma endo-xilanase purificada de *A. oryzae* apresentou uma maior afinidade por substratos de cadeias maiores (GP 200) ao passo que uma segunda endo-xilanase purificada do mesmo microrganismo preferia substratos com baixo grau de polimerização (GP 30-40) (BAILEY *et alii*, 1991).

-Quanto ao ponto isoelétrico e peso molecular

WONG *et alii*, (1988) classificaram endo-xilanases de múltiplos sistemas de acordo com o ponto isoelétrico e peso molecular. Xilanases de alto peso molecular/ácidas podem ser encontradas em *Talaromyces byssochlamydoides* (PM-54 kDa; pI-3,8) (YOSHIOKA *et alii*, 1981), *Bacillus circulans* (PM-85 kDa; pI-4,45) (ESTEBAN *et alii*, 1982) e *Lentinus edodes* (PM- 41 kDa; pI-3,6) (MISHRA *et alii*, 1990). Xilanases de baixo peso molecular/básicas podem ser encontradas em *Clostridium* spp.(PM 29 kDa; pI 8,5) (LEE *et alii*, 1987a), *Streptomyces* spp.(PM 25 kDa; pI 10,0) (YASUI *et alii*, 1988) e algumas vezes em *Aspergillus niger* (PM-13 kDa; pI 8,6) (FOURNIER *et alii*, 1985; KORMELINK, 1993).

Há dados na literatura que permitem algumas generalidades em relação a aplicações de endo-xilanases de alto e baixo pesos moleculares. Endo-xilanases de alto peso molecular apresentam maior eficiência catalítica com oligossacarídeos curtos. No entanto, para alguns casos as diferenças no peso molecular não são acompanhadas por diferenças nas propriedades catalíticas (YASUI *et alii*, 1988).

Purificação e Caracterização de Endo-Xilanases

Xilanases foram purificadas de numerosos microrganismos, por exemplo bactérias, leveduras e fungos. A Tabela 2 apresenta uma lista de endo-xilanases purificadas de várias fontes, incluindo seu peso molecular, pH ótimo e produtos de reações.

TABELA 2: Características de Endo-(1,4)- β -D-Xilanases Isoladas de Microrganismos

Gênero	PM (kDa)	pH _{ótimo}	Produtos de hidrólise da xilana	Referência
<i>Aspergillus</i>	20,8	5,0	X ₂ , X ₃ , X ₄	FREDERICK <i>et alii</i> (1981)
<i>Aureobasidium</i>	20,0	4,5	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	LEATHERS (1989)
<i>Penicillium</i>	11,0	3,0	X ₂ , X ₃	FUNAGUMA <i>et alii</i> (1991)
<i>Humicola</i>	21,5	6,0	X ₁ , X ₂ , X ₃	KITPREECHAVANICH <i>et alii</i> (1984)
<i>Lentinula</i>	41,0	4,5	X ₁ , X ₂ , X ₃	MISHRA <i>et alii</i> (1990)
<i>Trichoderma</i>	20,0	5,0	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	TAN <i>et alii</i> (1985)
<i>Bacillus</i>	22,0	6,0	X ₁ , X ₂	ESTEBAN <i>et alii</i> (1983)
<i>Bacillus</i>	39,5	7,0	X ₂ , X ₃	NANMORI <i>et alii</i> (1990)
<i>Streptomyces</i>	21,9	4,5	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	KESKAR <i>et alii</i> (1989)

X₁ = Xilose; X₂ = Xilobiose; X₃ = Xilotriose; X₄ = Xilotetrose

Endo-xilanases de fungos têm pesos moleculares na faixa de 7 a 60 kDa. e são geralmente mais ativas a pH 3,5-6,0 e 40-60°C (TAN *et alii*, 1987; BISWAS *et alii*, 1990;

BAILEY *et alii*, 1991). Endo-xilanases de origem bacteriana apresentam geralmente pesos moleculares na faixa de 15 a 85 kDa., com poucas exceções, e são mais ativas a pH 5,0-8,0 e 50-80°C (UCHINO & NAKANE, 1981; ESTEBAN *et alii*, 1983, NISHITANI & NEVINS, 1991).

Em geral, os produtos de hidrólise de xilanas por xilanases são xilose (X₁), xilobiose (X₂), xilotriose (X₃) e uma mistura de xilo-oligossacarídeos. Juntamente a esses produtos são liberados oligossacarídeos contendo substituintes arabinofuranosil e glucopiranosil (DEKKER & RICHARDS, 1975 a; 1975b; RICHARD & SHAMBE, 1976; JOHN *et alii*, 1979; COMTAT, 1983; WOOD & McCRAE, 1986; JOHN & SCHMIDT, 1988; KHANDKE *et alii*, 1989; NISHITANI & NEVINS, 1991).

Uma endo-xilanase purificada de *Bacillus subtilis* atua em xilanas obtidas de grão de milho e produz uma xilohexose contendo um ácido glucopiranosídico. Nenhuma atividade foi observada com arabinoxilana sugerindo que a enzima requer a presença de ramificações contendo ácidos glucopiranosídicos e portanto foi designada glucuranoxilana xilano-hidrolase (NISHITANI & NEVINS, 1988, 1991).

Observações semelhantes foram feitas para duas endo-xilanases de *Aspergillus niger* em relação aos substituintes L-arabinofuranosídicos (FREDERICK *et alii*, 1985). Os resultados mostraram uma baixa atividade de endo-xilanases com xilo-oligossacarídeos lineares e a ausência de atividade com xilanas lineares. No entanto, a presença de substituintes na cadeia de xilana reduz a atividade das xilanases produzidas por *Bacillus polymyxa* (MORALES *et alii*, 1993).

Dois xilanases de *Trichoderma longibrachiatum* sofreram inibição por xilotriose. Longos oligômeros apareceram no hidrolisado em consequência da reduzida atividade das enzimas sobre esses substratos, porém uma atividade de transferase inerente a esta xilanase também poderia justificar o aparecimento de novos oligômeros (TENKANEN *et alii*, 1992).

A inibição de endo-xilanases por diferentes componentes e compostos químicos específicos, fornece informações sobre a estrutura do sítio ativo e mecanismo de catálise. Endo-xilanases de várias fontes são inibidas por íons metálicos como Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} . O íon mercúrio foi o inibidor mais potente, sugerindo a presença de grupos tiol no sítio ativo (BASTAWDE, 1992). Por outro lado, foi observada uma ativação por íons cálcio, manganês e zinco para uma endo-xilanase clonada em *Streptomyces* sp (KLUEPFEL *et alii*, 1992).

Reagentes alquilantes como p-cloromercuribenzoato, N-bromosuccinamida, iodo e ácido iodo acético também inibiram a atividade de endo-xilanase, sugerindo que a enzima requer grupos -SH. Baseado na cinética de inativação e na modificação química da enzima por N-bromosuccinamida, p-hidroximercuribenzoato e brometo de 2-hidroxi-5-nitrobenzil brometo, evidenciou-se o envolvimento de resíduos de triptofano e cisteína nos sítios ativos de xilanase de *Streptomyces*, *Bacillus* e *Chainia* (KESKAR *et alii*, 1989; DESHPANDE *et alii*, 1990). Foi demonstrado que a adição de xilana junto com bromosuccinamida protege a xilanase de *Bacillus stearothermophilus* de inativação, indicando assim que o resíduo de triptofano estaria no sítio ativo e não em outro sítio de ligação (KHASIN *et alii*, 1993). Grupos carboxílicos estão envolvidos no mecanismo de catálise de endoxilanases de *Schizophillum commune* (BRAY & CLARKE, 1990) e de *Streptomyces* sp (MARUI *et alii*, 1993).

(1,4)- β -xilosidases

β -xilosidases foram purificadas de fungos, bactérias e leveduras e hidrolisam pequenos xilo-oligossacarídeos a partir do terminal não redutor liberando xilopiranoses. Além da atividade hidrolítica muitas β -xilosidases tem uma alta atividade de transferase o que provoca a formação de oligossacarídeos de peso molecular maior que o substrato original (REILLY, 1981).

Em comparação às endo-xilanases, β -xilosidases apresentam um peso molecular mais elevado. Elas são mais ativas na faixa de pH de 4,0 a 7,0 e a temperaturas entre 40 e 80°C (KITPREECHAVANICH *et alii*, 1986; JOHN & SCHMIDT, 1988) (Tabela 3).

TABELA 3. Características de β -Xilosidases Isoladas de Microrganismos

Gênero	PM (kDa)	T _{ótima} (°C)	pH _{ótimo}	Referência
<i>Aspergillus</i>	360	75	4,5	KITPREECHAVANICH <i>et alii</i> (1986)
<i>Neurospora</i>	83	55	4,5	DESHPANDE <i>et alii</i> (1986)
<i>Penicillium</i>	110	55	4,0	MATSUO <i>et alii</i> (1987)
<i>Trichoderma</i>	100	70	4,5	JOHN & SCHMIDT (1988)
<i>Bacillus</i>	190	30	6,5	ESTEBAN <i>et alii</i> (1983)
<i>Clostridium</i>	224	45	6,0	LEE & FORSBERG (1987)
<i>Pichia</i>	34	30	4,5	OZCAN <i>et alii</i> (1991)

A atividade de β -xilosidases é inibida por íons metálicos como Hg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} e Ag^{+} . Xilose, arabinose e mesmo glicose podem também inibir fortemente a atividade enzimática (CLAEYSSSENS *et alii*, 1970a e 1970b; RODIONOVA *et alii*, 1983; JOHN & SCHMIDT, 1988; LACHKE & DESHPANDE, 1988; SMITH *et alii*, 1991).

Diferenças entre β -xilosidases podem ser observadas nos valores de K_M para diferentes substratos como p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, xilobiose e xilo-oligossacarídeos de maior peso molecular. As β -xilosidases de *Trichoderma reesei*

(POUTANEN & PULS, 1988) e *Neurospora crassa* (DESHPANDE *et alii.*, 1986) foram mais ativas quando se utilizou p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo como substrato.

A afinidade de β -xilosidase em degradar xilana e xilo-oligossacarídeos é fundamental na conversão total da biomassa a monossacarídeos. Pequenos xilo-oligossacarídeos lineares podem ser convertidos completamente a xilose por β -xilosidases, contudo a afinidade em relação aos xilo-oligossacarídeos diminuiu com o aumento da cadeia (TAKENISHI *et alii.*, 1973; REILLY, 1981).

TAKENISHI *et alii.* (1973), observaram que uma β -xilosidase de *Aspergillus niger* atuava em arabinoxilobiose e arabinoxilotriose deixando como produtos finais xilose e arabinoxilobiose, respectivamente. A hidrólise de xilo-oligossacarídeos por β -xilosidases torna-se mais complicada quando apresentam arabinose ou ácido glucurônico em sua estrutura, nestes casos pode ocorrer interferência no sítio ativo.

β -xilosidases purificadas de *Aspergillus niger* (JOHN *et alii.*, 1979) e *Trichoderma lignorum* (JOHN & SCHMIDT, 1988) não produziram xilose a partir de arabinoxilotetraose, provavelmente porque uma arabinofuranose estava ligada à xilose do terminal não redutor. Resultados semelhantes foram obtidos com uma β -xilosidase comercial atuando em arabinoxilobiose e arabinoxilotriose (BRILLOUET, 1987). Quando se incubou uma β -xilosidase purificada de *Thermoascus aurantiacus* com uma xilotriose contendo o substituinte ácido (4-O-metil)glucopiranosídico, não se detectou o aparecimento de xilose (KHANDKE *et alii.*, 1989). A incapacidade de hidrólise a partir do terminal não redutor foi atribuída a diferenças de especificidade e também ao impedimento estérico causado pelo substituinte.

α -L-Arabinofuranosidases

As α -L-Arabinofuranosidases são enzimas que atuam em L-arabinosídeos de baixo peso molecular e seus oligossacarídeos. Este grupo de enzimas atua juntamente com as

endo-xilanases e β -xilosidases para hidrólise de arabino(glucurono)xilanas. As α -L-arabinofuranosidases têm sido purificadas de fungos, bactérias e leveduras. Em comparação a endo-xilanases, apresentam peso molecular relativamente alto (400 kDa) e pH ótimo entre 2,4-7,0 (BRILLOUET *et alii.*, 1985, POUTANEN, 1988).

A utilização desta enzima para hidrólise de arabinoxilanas reduz a solubilidade do substrato devido a agregação intermolecular. Um pré-tratamento de arabinoxilana com endo-xilanases que não apresentem atividade desramificadora, seguido de um tratamento com arabinofuranosidase seria a melhor alternativa para prevenir a agregação de longas cadeias e a obtenção de um máximo de rendimento em monossacarídeos (ANDREWARTHA *et alii.*, 1979).

Acetil(xilana)esterase

Um grupo de enzimas de grande importância na hidrólise de xilana proveniente de madeiras duras são as acetil esterases. Estas enzimas hidrolisam ligações éster de alifáticos e aromáticos e removem grupos O-acetil de xilanas ou oligossacarídeos.

Acetil esterases foram detectadas em *Schizophyllum commune* (BIELY *et alii.*, 1986; BIELY *et alii.*, 1988), *Trichoderma reesei* (BIELY *et alii.*, 1986; POUTANEN *et alii.*, 1987; BIELY *et alii.*, 1988; GATTINGER *et alii.*, 1990; SUNDBERG & POUTANEN, 1991), *Aspergillus niger* (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et alii.*, 1992; KORMELINK *et alii.*, 1993), *Aspergillus oryzae* (TENKANEN *et alii.*, 1992), *Fusarium oxysporum* (POUTANEN *et alii.*, 1987; BALL & McCARTHY, 1988; JOHNSON *et alii.*, 1988), *Rhodotorula mucilaginosa* (LEE *et alii.*, 1987b), *Butyvirbio fibrisolvens* (HESPELL & O'BRYAN-SHAH, 1988) e *Aureobasidium pullulans* (MYBURGH *et alii.*, 1991).

Até o momento poucas acetil esterases foram purificadas, a maior parte delas são obtidas de fungos e bactérias. As esterases apresentam pesos moleculares na faixa de 30 a 70 kDa, com poucas exceções. Elas são mais ativas na faixa de pH de 5,0 a 8,0 e a

temperaturas variando de 40-80 °C (POUTANEN & SUNDBERG, 1988; SUNDBERG *et alii*, 1990).

Acetil esterases são importantes na degradação de xilanas acetiladas porque em geral os substituintes acetil impedem a ação de endo-xilanases. Tem sido demonstrado que a acetil esterase e endo-xilanase atuam cooperativamente na hidrólise de acetil xilana (BIELY *et alii*, 1986).

Dependendo do peso molecular do substrato e da especificidade da acetil esterase, uma distinção pode ser feita entre acetil xilana esterase e acetil esterase. Acetil xilana esterase é capaz de liberar ácido acético de xilana acetilada sem a cooperação de endo-xilanases, enquanto acetil esterase necessita da cooperação de uma endo-xilanase para liberar ácido acético (POUTANEN & SUNDBERG, 1988; POUTANEN *et alii*, 1990, SUNDBERG & POUTANEN, 1991).

α -Glucuronidases

α -Glucuronidases são enzimas que hidrolisam resíduos (4-O-metil)glucurônico, e que auxiliam na conversão total de (arabino)glucuronoxilanas a monossacarídeos. As análises estruturais da parede celular mostraram que grupos carboxílicos do ácido metilglucurônico estão ligados a grupos hidroxilas da lignina (SMITH & FORSBERG, 1991).

α -Glucuronidases têm sido detectadas no filtrado de cultura de *Trichoderma reesei* (POUTANEN *et alii*, 1987; DEKKER, 1983), *Streptomyces olivochromogenes* (MACKENZIE *et alii*, 1987; JOHNSON *et alii*, 1988), *Lentinus edodes* (MISHRA *et alii*, 1990), *Aspergillus awamori* e *Aspergillus phoenicis* (SMITH *et alii*, 1991), *Fibrobacter succinogenes* S85 (SMITH & FORSBERG, 1991).

PULS *et alii* (1987), detectaram atividade de α -glucuronidase em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*. Ambas enzimas apresentam pesos moleculares elevados e

foram mais ativas a altas temperaturas e condições ácidas. A α -glucuronidase de *Agaricus bisporus* atuou sinergicamente com endo-xilanases na hidrólise de xilana. Os oligossacarídeos puderam ser hidrolisados por β -xilosidases depois que os ácidos 4-O-metilglucurônico foram removidos. Uma segunda enzima purificada de *Thermoascus aurantiacus* hidrolisou xilo-oligômeros contendo resíduos de ácido glucurônico (KHANDKE *et alii*, 1989).

2.3. Fatores que Influenciam a Produção de Xilanases por Microrganismos

As xilanases podem diferir em ocorrência e concentração dependendo das condições metabólicas da célula. Alguns microrganismos as sintetizam independente da necessidade, em velocidades e quantidades constantes e são ditas constitutivas. Geralmente são indutivas, ocorrem inicialmente em quantidades traço, e aumentam sua concentração na presença de um determinado substrato. Os processos metabólicos e bioquímicos que determinam a síntese de xilanases por microrganismos estão geralmente associados a mudanças nutricionais e são favorecidos pelas condições de cultivo, pH e temperatura.

Fonte de Carbono e Energia

Na produção de xilanases por processo fermentativo emprega-se principalmente xilana comercial como substrato. Infelizmente a utilização de xilana altamente purificada para produção de xilanases em escala comercial é economicamente inviável. Muitos estudos vem sendo realizados com o objetivo de desenvolver a produção de xilanases em matérias primas mais baratas, ricas em xilana. Os melhores substratos para este propósito parecem ser os hidrolisados hemicelulósicos obtidos de madeira tratada com vapor

(SENIOR *et alii*, 1989) e resíduos de plantas como farelo de trigo (BAILEY & POUTANEN, 1989). SENIOR *et alii* (1989), que cultivaram *T. harzianum* E58 em meio contendo xilana acrescida de um hidrolisado pré-tratado por explosão a vapor verificaram que a produção de xilanase foi muito baixa durante o início do cultivo, mas aumentou após o terceiro dia.

O bagaço de cana-de-açúcar vem sendo utilizado em diversos trabalhos visando a produção de xilanases (DEKKER, 1983; CHAUDRI *et alii*, 1988; MILAGRES & LACIS, 1991; SAXENA *et alii*, 1991; KESKAR, 1992; KARNI *et alii*, 1993; MILAGRES *et alii*, 1993). Acredita-se que, por se tratar de um substrato bastante heterogêneo possa ser fonte de indução de endo-xilanases e de outras enzimas necessárias para a completa hidrólise de xilana (MILAGRES & LACIS, 1991). De acordo com CHAUDRI *et alii* (1988), 1,5% (p/v) de bagaço induziu 25 U/mL de xilanase em 72 horas. Dos resíduos testados por RAJARAM & VARMA (1990), o bagaço foi o melhor indutor de xilanases.

Vários estudos têm mostrado que o tipo de microrganismo e também a natureza da fonte de carbono principal podem alterar os níveis e o número de proteínas com atividade de xilanase (CHAUDHARY & TAURO, 1982; BIELY, 1985; HRMOVÁ *et alii*, 1986; WILLIAMS & WITHER, 1992; KARNI *et alii*, 1993; OKEKE & OBI, 1993). Foi constatado também que algumas bactérias e fungos produzem enzimas inespecíficas, ou seja, com atividades conjuntas de xilanases e celulasas (JOHN *et alii*, 1979; LEE *et alii*, 1987b; OKEKE & PATERSON, 1992). No entanto, a produção seletiva de xilanase pode ser observada em espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* durante o cultivo em xilana (HRMOVÁ *et alii*, 1986; 1991). Similarmente, *Thermomyces laguginosus* produziu alta atividade de xilanase, livre de celulase, em xilana pura (GOMES *et alii*, 1993).

Estudos desta natureza são complicados pelo fato que muitas celulasas e xilanases não são específicas com respeito aos substratos, celulose ou xilana. Esta falta de especificidade é mais frequentemente observada para celulasas porque seus sítios de ligação podem aceitar um polímero de D-xilopiranoses β -(1,4) sem substituições.

A resposta de fungos filamentosos a fragmentos de baixo peso molecular de xilana e celulose confirmaram a existência de um controle separado de indução de xilanases e celulasas. Xilobiose foi um indutor específico de xilanases em *T. reesei* (HRMOVÁ *et alii*, 1986) e *A. terreus* (HRMOVÁ *et alii*, 1991) ao passo que sofrorose e outras glicobioses induziram seletivamente a síntese de celulasas (HRMOVÁ *et alii*, 1986).

O grau de seletividade de formação de xilanases por *Trichoderma reesei* QM9414 é dependente da relação existente entre o teor de nitrogênio e carbono no meio (HRMOVÁ *et alii*, 1986; BIELY *et alii*, 1988). Segundo os autores, o mecanismo que governa a formação das enzimas é influenciado pela disponibilidade de precursores da síntese de proteína. A falta de tais precursores possibilita a regulação separada da síntese de celulasas e xilanases pelas fontes de carbono disponíveis. A produção de sistemas xilanolíticos, livre de celulasas, em fungos pode ser realizada cultivando os microrganismos em xilana totalmente pura, sem contaminantes de celulose e sob uma baixa relação do conteúdo de nitrogênio para carbono. De qualquer modo, esta estratégia não se aplica a todos os fungos (STEINER *et alii*, 1987; BIELY *et alii*, 1988).

Fornecimento de Oxigênio

As principais finalidades de se aerar e agitar uma cultura submersa são fornecer oxigênio para os microrganismos e manter a homogeneidade dos meios de fermentação. Pesquisas recentes revelaram que a produção de xilanases é um processo dependente de oxigênio, tanto na fase de crescimento do microrganismo quanto durante o acúmulo da enzima. Neste processo o oxigênio deve ser mantido em um nível apenas suficiente para evitar limitações ou diminuição da respiração normal dos microrganismos (GUSEK *et alii*, 1991).

O problema do fornecimento de oxigênio durante a fermentação é muito complicado, já que a demanda de oxigênio pode variar de microrganismo para

microrganismo e depender muito das condições utilizadas no processo . Segundo MITARD & RIBA (1988), no caso de microrganismos filamentosos, muitas relações existem entre variáveis mecânicas (agitação, transferência de oxigênio), propriedades do meio e parâmetros específicos do fungo (velocidade de crescimento, morfologia).

Com respeito a influência do oxigênio na produção de xilanase, foi verificado que, para *Cellulomonas* sp houve um aumento da atividade quando se reduziu o teor de oxigênio no meio (RODRIGUEZ *et alii*, 1991).

2.4. Produção de Xilanase em Fermentadores

Os estudos de parâmetros físicos e biológicos da síntese de xilanase são na maioria realizados em incubadora de movimento rotatório. O uso do fermentador visa, principalmente, otimizar parâmetros que não são facilmente controlados em frascos Erlenmeyers e indicar condições para síntese em escala industrial (SMITH *et alii*, 1991).

Poucos trabalhos envolvendo cinética da produção de xilanase são encontrados na literatura. Estudos preliminares da produção de xilanasas em fermentadores foram realizados por PANDA *et alii* (1989), GUSEK *et alii* (1991), RODRIGUEZ *et alii* (1991), BAILEY & VIKARI (1993) e PALMA (1993). Em todos os trabalhos obtiveram níveis mais baixos de atividade de xilanase em fermentadores que em incubadora de movimento circular. Conforme observado por GOMES *et alii* (1993), a produção de xilanase em fermentadores atingiu os valores máximos em menor tempo que em agitador de movimento circular.

2.5. Aplicações Industriais de Xilanase

O grande interesse na produção de xilanase está relacionado à vasta aplicação que esta enzima possui no setor industrial, abrangendo desde a substituição de etapas de processos correntes até o estabelecimento de outros inteiramente novos.

A aplicação de xilanase se divide em duas categorias: uma, livre de celulasas e a outra com uso associado de polissacaridasas (BIELY, 1985). Como exemplo da primeira categoria, tem-se o uso de xilanase nas indústrias têxtil e de celulose e papel. Por outro lado, o uso associado de xilanase, celulase e pectinase se aplica à indústria de alimentos.

Xilanase pode ser utilizada na indústria de alimentos na clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na fabricação de pães, visando aumentar seu volume e melhorar a textura da casca e miolo (MUTSAERS, 1991), na etapa de filtração da cerveja, rompendo sólidos em suspensão (VAN DER BROECK *et alii*, 1990).

Xilanase adicionada à ração para aves e suínos, aumenta sua digestibilidade (BRICE & MORRISON, 1991). Há também o interesse em utilizá-la para produção de xilose, xilobiase e xilo-oligômeros que podem ser empregados como insumos para obtenção de xilitol ou ácido láctico por via fermentativa (WONG *et alii*, 1988, GILBERT *et alii*, 1992).

Atualmente, a aplicação mais promissora de xilanase é na indústria de celulose e papel. A xilanase pode ser utilizada nas etapas da fabricação de celulose tais como descorticamento, refino e dissolução das polpas, e em geral, reduzem o gasto de energia dos processos (VIKARI, 1991).

No refino, as enzimas são adicionadas às fibras para melhorar a fibrilação externa e assim aumentar o grau de interligação do papel (NOE *et alii*, 1986). Alternativamente, preparações enzimáticas contendo celulasas e hemicelulasas têm sido usadas para

aumentar a fibrilação e propriedades de drenagem de fibras recicladas (POMMIER *et alii*, 1989).

Polpas dissolvidas são usadas na manufatura de acetato, celofane e rayon. Para esta finalidade a celulose deve ser totalmente pura, sem resíduos de hemiceluloses ou lignina (WONG & SADDLER, 1992). PAICE & JURASEK (1984), prepararam uma polpa kraft apropriada à manufatura de rayon e utilizaram xilanase para remover a xilana residual.

Recente aplicação biotecnológica na indústria de celulose e papel tem sido dirigida para o branqueamento de polpas com enzimas, como uma alternativa para auxiliar a remoção da lignina residual que lhe confere uma cor escura. O presente trabalho aborda o estudo de xilanase e ligninase microbianas na etapa de branqueamento de polpas Kraft de eucalipto. Embora tenham sido desenvolvidos muitos trabalhos a respeito de biobranqueamento com enzimas, sistemas biológicos novos contendo diferentes tipos de enzimas é um ponto necessário na otimização do processo e ainda em aberto.

2.6. Branqueamento de Polpas de Celulose

Tradicionalmente, são necessários dois estágios para obtenção de uma polpa de celulose pura, apropriada para fabricação de papel, são eles: cozimento e branqueamento. O processo de cozimento mais importante é o kraft, que envolve o uso de sulfito, bissulfito e íons hidroxila para degradar a lignina da madeira, deixando-a solúvel no licor de cozimento (PATEL *et alii*, 1993). Sob condições de alta temperatura e pressão 90 a 95% da lignina original é modificada ou solubilizada, o conteúdo de hemiceluloses é modificado e as fibras se separam. A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido a alta temperatura e pH. Entretanto, à medida que o processo vai ocorrendo a alcalinidade diminui e a xilana degradada precipita-se de uma forma mais ou menos cristalina sobre a celulose (BUCHERT *et alii*, 1992). Neste estágio as fibras são escuras, principalmente

porque ainda contém lignina (3-5%), condensada durante o cozimento. A cor marrom das polpas é devido a várias estruturas conjugadas incluindo quinonas, catecóis e outras substâncias que absorvem a luz visível. Subseqüentes branqueamentos são necessários para removê-las e com isso elevar a alvura da polpa (VIIKARI, 1991).

O branqueamento da polpa kraft é feito por seqüências de múltiplos estágios. Na primeira parte, chamado pré-branqueamento, a maioria da lignina é removida sem que ocorra um aumento excessivo da alvura da polpa. A deslignificação se realiza tipicamente por reações de substituição e oxidação com cloro (C) ou misturas de cloro e dióxido de cloro (C + D). Após lavagem, este estágio é seguido por extração com hidróxido de sódio (E) durante o qual os componentes solúveis em álcali são removidos. O verdadeiro branqueamento da polpa ocorre na segunda parte da seqüência pela aplicação de oxidantes tais como dióxido de cloro (D), hipoclorito (H), peróxido de hidrogênio (P) e estágios de extração à polpa (BAJPAI & BAJPAI, 1992).

A produção global de polpas químicas está em torno de 100 milhões ton/ano (VIIKARI, 1991). Como qualquer outra indústria de grande escala, a indústria de celulose e papel exerce seu impacto no ambiente, liberando um cheiro desagradável de enxofre no ar e produzindo efluentes contendo substâncias que reduzem o nível de oxigênio de rios e lagos.

Mais recentemente, tem aumentado a preocupação com os efeitos biológicos diretos em ecossistemas aquáticos de efluentes de branqueamento à base de cloro. Os compostos organoclorados formados durante o branqueamento de polpas químicas é que têm sido alvo de atenção. Estas substâncias são provenientes de reações entre lignina presente nas fibras e o cloro usado para branqueamento. Alguns desses compostos evaporam, enquanto outros são arrastados e se agregam ao efluente (CARLBERG *et alii*, 1987; ONYSKO, 1993). A maior parte deles tem sido identificada como tóxicos, mutagênicos, persistentes e bioacumulativos. Em testes de laboratório, os compostos organoclorados, quando avaliados em concentrações muito acima daquelas que são normalmente encontradas nos

efluentes, apresentam atividade tóxica e mutagênica em diversos organismos. Alguns dos compostos organoclorados nos efluentes são resistentes à degradação e permanecem por muitos anos nos ecossistemas em que são despejados. Talvez o fato que mais despertou o interesse em restringir a descarga de material organoclorado foi a recente constatação de dioxina, um dos compostos mais tóxicos conhecidos, em polpas kraft branqueada com cloro molecular e seu licor residual de branqueamento (MOUNTEER, 1992).

Mais recentemente, em 1989, os países nórdicos propuseram algumas regulamentações a respeito da descarga de organoclorados na indústria de papel. Limitações nos níveis de compostos organoclorados adsorvidos (AOX) estão levando a alterações nos processos convencionais de cozimento, branqueamento e tratamento de efluentes (AXEGARD, 1989). As primeiras medidas foram tomadas em relação ao tratamento de efluentes, hoje a ênfase está sendo dada a: 1) se obter processos de polpação mais eficientes, reduzindo o número kappa, tanto quanto possível, antes do branqueamento, por meio de deslignificação com oxigênio e 2) a substituição do cloro molecular por outros reagentes de branqueamento, tais como dióxido de cloro, oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio (HELMLING *et alii*, 1989; MACLEOD, 1991, MOUNTEER, 1992).

Mesmo com a maior eficiência demonstrada pelos sistemas de tratamento externo para remoção de material organoclorados dos efluentes e das inovações nos processos de branqueamentos, as fábricas que produzem celulose estão buscando alternativas que permitam eliminar totalmente o cloro molecular da planta de branqueamento, para responder à demanda crescente do mercado por este tipo de polpa. Uma alternativa proposta para eliminar o cloro molecular é o biobranqueamento, que baseia-se na adição de microrganismos ou enzimas como uma etapa do branqueamento.

2.6.1 Deslignificação com Microrganismos

Na natureza, a degradação de lignina é realizada por bactérias (VICUÑA, 1988), e também por fungos, principalmente os da podridão branca (ERICSSON, 1990). A partir de KIRK & YANG (1979), iniciaram-se os estudos para utilização de fungos da podridão branca com o objetivo de branquear polpas. Vários experimentos com *Phanerochaete chrysosporium* demonstraram que o número Kappa podia diminuir em 50-75% em 6-8 dias, apesar de o conteúdo de celulose ser reduzido à metade. PAICE *et alii* (1989) avaliaram nove cepas de fungos quanto a sua habilidade em branquear polpa kraft. O fungo *Coriolus versicolor* produziu uma polpa com maior brilho e menor número kappa após 5 dias de incubação, no entanto houve redução da viscosidade.

A utilização de fungos para degradar lignina é extremamente complexo. A eficiência da deslignificação depende das condições de cultivo (nutriente, pH, oxigênio, modo de cultivo) e incubação do fungo (ERICSSON, 1990). No entanto, o maior empecilho do processo de branqueamento por fungos é o longo tempo que o microrganismo deve permanecer em contato com a polpa, de 5 a 14 dias (KIRK & YANG, 1979; KIRKPATRICK *et alii*, 1990; REID *et alii*, 1990). Seria também necessário reatores muito grandes para suprir o consumo diário da fábrica. Os filtrados de caldo de cultivo são mais fáceis de operar, necessitando de um período de contato mais curto e um menor custo que as culturas de fungos (VIAKARI *et alii*, 1987).

2.6.2 Branqueamento em Sequências com Enzimas Ligninolíticas

O branqueamento com enzimas ligninolíticas, quando ocorre, necessita de várias enzimas, cada uma com uma função diferente. A primeira enzima ligninolítica identificada foi lignina peroxidase (ligninase) (TIEN & KIRK, 1983). As lignina peroxidases são hemoproteínas capazes de catalisar a oxidação de anéis aromáticos não fenólicos da

lignina a radicais cátions na presença de peróxido de hidrogênio. As características e produção de lignina peroxidases de *Phanerochaete chrysosporium* já foram muito estudadas e sabe-se que este organismo também produz peroxidases dependente de manganês as quais oxidam unidades fenólicas da lignina (ARCHIBALD, 1992). *Coriolus versicolor* produz além das duas enzimas anteriormente mencionadas, outro grupo denominado de lacases.

Sabe-se que lignina peroxidases e lacases apresentam um papel importante na degradação de lignina, mas que também promovem reações de oxidação que resultam em polimerização da lignina (VIKARI *et alii*, 1986; 1987; ARCHIBALD, 1992). No entanto, ONYSKO (1993), descreveu a despolimerização de uma lignina sintética por uma lignina peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e álcool veratrílico, mas seu efeito não foi demonstrado com lignina de madeira ou polpa.

Celobiose quinona redutase (CBQase), uma enzima que pode estar envolvida na regulação de reações de polimerização e despolimerização de culturas fúngicas, diminuiu a polimerização da lignina kraft por lignina peroxidase (BAJPAI & BAJPAI, 1992).

Branqueamento biológico utilizando lignina peroxidase tem sido relatado em algumas patentes (FARREL, 1987; OLSEN *et alii*, 1991), contudo há pouca informação detalhada sobre a eficácia de lignina peroxidase no branqueamento de polpas. FARREL (1987), refere-se à utilização de enzimas de *P. chrysosporium* para aumentar as propriedades de força e brilho de polpas mecânicas. Outros pesquisadores não obtiveram os mesmos efeitos de branqueamento quando trabalharam com preparações enzimáticas de *P. chrysosporium* (VIKARI *et alii*, 1987).

2.6.3 Branqueamento com Xilanases

Uma outra alternativa que tem sido estudada visando reduzir o consumo de reagentes a base de cloro durante o branqueamento é o uso de xilanases. A maneira exata

de como as xilanases agem branqueando as polpas ainda não está totalmente esclarecida. Existem algumas teorias que tentam explicar a redução dos níveis de cloro usados no branqueamento através da hidrólise da xilana. Uma delas menciona que o tratamento com xilanases tem a função de remover a xilana reprecipitada da superfície da polpa, ocorrida quando a alcalinidade do cozimento cai e obtém-se valores de pH abaixo de 13. A remoção desta xilana provavelmente aumentaria a permeabilidade da fibra e acessibilidade dos reagentes à lignina (VIAKARI, 1991) (Figura 8).

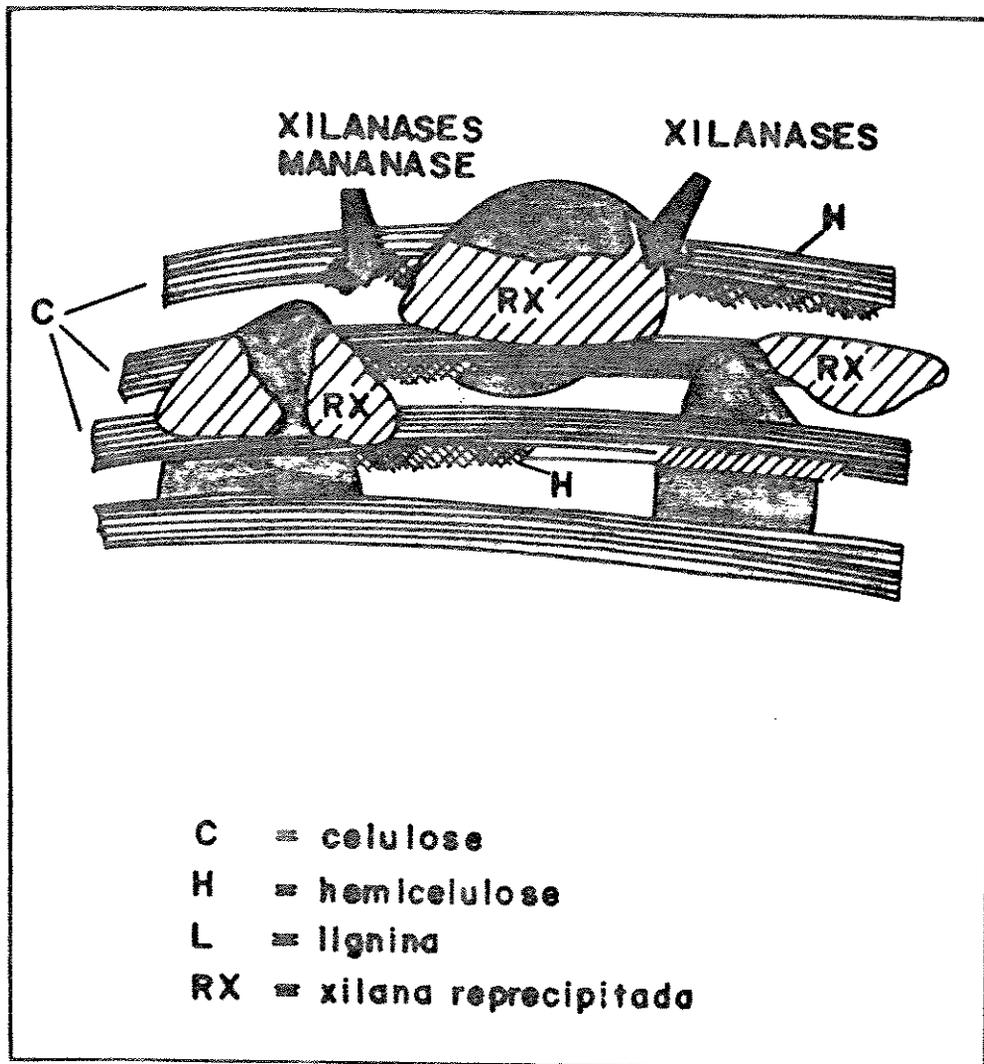


FIGURA 8. Esquema Proposto por VIAKARI (1991) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft.

Uma segunda teoria, baseia-se em estudos estruturais que indicam que na madeira, a lignina está ligada a polissacarídeos, através dos complexos lignina-carboidratos (LCC). Algumas das ligações envolvendo tais complexos são álcali-resistentes e não se hidrolisam durante o cozimento kraft, conseqüentemente alguma lignina residual permanece ligada à hemicelulose após o cozimento (BUCHERT *et alii*, 1992). Nesta teoria, o tratamento enzimático hidrolisaria xilana a pequenos fragmentos permitindo que a lignina associada a essas pequenas cadeias de hemicelulose seja mais facilmente removida através de subseqüentes extrações (PAICE *et alii*, 1992) (Figura 9).

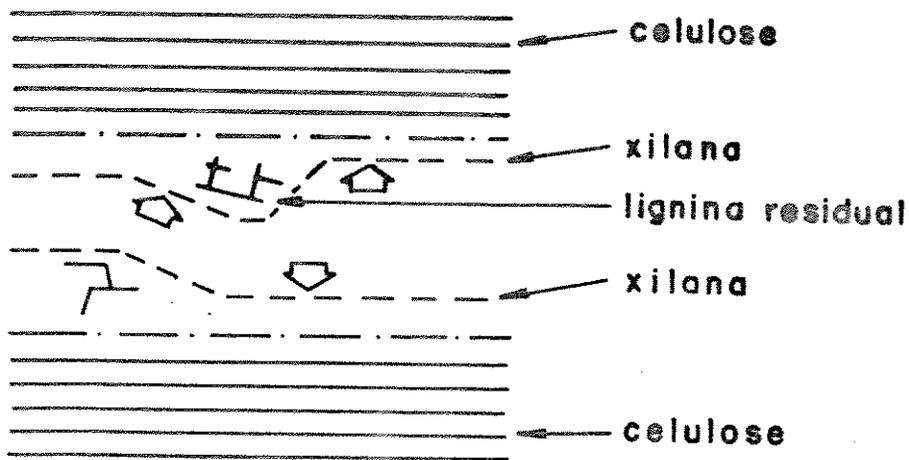


FIGURA 9. Esquema Proposto por PAICE *et alii* (1992), para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft.

A ligação entre a lignina e xilana é feita possivelmente através das cadeias laterais de arabinose (FENGEL & WEGENER, 1989). A hidrólise parcial da fração hemicelulósica por xilanases aumenta a susceptibilidade à remoção da lignina nos estágios de cloração e extração alcalina. O efeito do branqueamento só é visível após o estágio de extração ou cloração.

ROSS *et alii* (1992), estudaram dois complexos de lignina-carboidrato provenientes da fração solúvel de polpa termomecânica, uma rica em glucomanana e outra em O-acetil-xilana e mostraram que o uso de acetil esterases e arabinases pode promover uma maior hidrólise das polpas.

SENIOR *et alii*, (1989), em estudos sobre o curso de hidrólise dos carboidratos da polpa mostraram que apenas 20-25% da xilana pode ser hidrolisada por xilanase.

A eficiência do tratamento enzimático das polpas está baseado no volume, tamanho e distribuição dos poros, os quais determinam a acessibilidade das enzimas às fibras. Limitações difusionais devido ao grande tamanho das xilanases pode ser um fator, já que o tamanho dos poros nas polpas kraft e sulfito variam de 5-6 nm (VIAKARI, 1991). De acordo com os resultados do modelo molecular de celulase de *Trichoderma reesei*, o diâmetro aproximado da enzima de peso molecular 56 kDa é 5 nm. Em geral os pesos moleculares de xilanases são baixos, mas é evidente que há pouca penetração de celulases, hemicelulases e ligninases na madeira, contrastando com as polpas, que são mais acessíveis. Tem sido também sugerido que a distribuição irregular de hemicelulose pode reduzir o acesso da enzima à xilana (CLARCK *et alii*, 1991). Uma outra razão é a limitada hidrólise de xilana devido a sua natureza ramificada, instabilidade térmica da enzima e a inibição pelo produto final, xilose (SENIOR *et alii*, 1991). Além disso, as xilanases adsorvem reversivelmente à celulose amorfa, diminuindo sua atividade. SENIOR *et alii* (1991), mencionaram que a adsorção de xilanase à polpa sulfito leva à perda da atividade, possivelmente pela presença de compostos inibidores provenientes da lignina.

A partir de resultados de açúcares solúveis, número kappa e de microscopia eletrônica obtidos após tratamento de polpas kraft de pinus com xilanases e posteriormente com hidróxido de sódio ou mananase, CLARCK *et alii* (1991), postularam que não há relação entre a extensão da remoção de hemicelulose e aumento do branqueamento. Seus resultados sugeriram que o mecanismo de branqueamento está relacionado ao processo de inchamento das fibras.

O tratamento de polpas com xilanases e posterior extração alcalina reduz o conteúdo de lignina, correspondendo a um decréscimo do número kappa de 2 a 4 unidades relativo à polpa não tratada (CHAUVET *et alii*, 1987; TOLAN & CANOVAS, 1992). A redução do conteúdo de lignina promove uma economia de agentes químicos e alguns trabalhos com polpa de madeira mole mostram que consegue-se diminuir o teor de cloro utilizado em tratamento de pinus em 35-45% (SENIOR & HAMILTON, 1992), 25% (VIKARI *et alii*, 1987; CLARCK *et alii*, 1991) e 20% (TOLAN & CANOVAS, 1992). Verificou-se que o pré-tratamento com xilanases substituiu de 5-7 Kg de dióxido de cloro por tonelada de polpa kraft de madeira mole (TOLAN & CANOVAS, 1992).

SENIOR *et alii* (1991), determinaram a relação entre a efetividade do pré-tratamento com xilanase e o nível de substituição do cloro na sequência de branqueamento. Polpas tratadas com xilanase necessitaram quase 80% menos cloro e 5% menos dióxido de cloro que a polpa controle para alcançar uma alvura de 90% ISO.

Em polpas termomecânicas as modificações enzimáticas podem ser alcançadas apenas na superfície das fibras, mesmo utilizando altas dosagens enzimáticas, apenas 1% da polpa foi dissolvida. Quando combinada com um tratamento alcalino, o tratamento enzimático reduziu a quantidade de energia para refinar a polpa (SENIOR *et alii*, 1991).

Outras hemicelulases não tiveram o mesmo sucesso. Apesar de madeiras moles conterem alto conteúdo de glucomanana, o tratamento com mananase não aumentou a extractibilidade da lignina de polpa kraft de pinus (CLARCK *et alii*, 1991). Segundo esses autores a maior parte da glucomanana se encontra nas camadas mais internas, sendo

menos acessíveis. Segundo PAICE *et alii* (1988), β -xilosidases não tiveram efeito na extração da lignina.

Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de medir o impacto do branqueamento biológico na qualidade do efluente. FUJITA *et alii* (1991), estudaram uma sequência de branqueamento com fungos e verificaram que a demanda química de oxigênio (DQO) e a cor da água residual foram reduzidos em 50 e 80 %, respectivamente. Os autores ainda sugeriram que maiores reduções poderiam ser obtidas fazendo-se um pré-tratamento com fungos, seguido com as sequências ED ou EDED, embora com uma pequena perda no rendimento.

O pré-tratamento de polpas com xilanases também tem levado a reduções nos níveis de halogênio orgânico adsorvível (AOX) (KOPONEN, 1990; SENIOR & HAMILTON, 1992) e dioxinas (ANÔNIMO, 1992) dos efluentes. Quando tratou-se polpa kraft com xilanase utilizando a sequência (CD)EDED, o valor de múltiplo de cloro molecular (% cloro molecular/nº kappa da polpa marrom) foi reduzido de 0,22 para 0,15, o qual foi abaixo do nível requerido para formação de dioxinas e furanos, 0,18- 0,19 (MANOIR *et alii*, 1991).

Os efluentes após o estágio com xilanases, cloração e extração foram misturados e avaliados. O valor de BOD foi o dobro do controle, DQO e TOC também aumentaram. A relação DBO/TOC foi muito mais alta para polpas tratadas com xilanases e isto indica que os efluentes destas polpas poderiam ser tratados mais facilmente (SENIOR & HAMILTON, 1992). Um outro estudo indicou que o tratamento enzimático, associado a redução de cloro no primeiro estágio de branqueamento, produz efluentes com níveis de AOX de 0,5 a 0,6 Kg por tonelada de polpa, cerca de oito vezes menor que os obtidos nos branqueamentos convencionais (KOPONEN, 1990).

3.OBJETIVOS

- Estudar o efeito de variáveis como pH, agitação e temperatura na produção de xilanases por *P. janthinellum*
- Após seleção das melhores condições para crescimento de *P. janthinellum* e produção de xilanases, utilizá-las em escala semi-piloto, empregando um fermentador de 4 litros
- Purificar e caracterizar parcialmente as xilanases
- Utilizar os extratos enzimáticos obtidos do cultivo de *P. janthinellum* para tratamento de polpas kraft de eucalipto
- Obter um processo de branqueamento usando baixas quantidades de cloro, ou livre de cloro gasoso, sem que ocorra perdas significativas na viscosidade da polpa
- Obter um processo de branqueamento que aumente a alvura da polpa por combinação de xilanases e ligninases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1) Microrganismo

Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram os fungos *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115, isolado de madeira em decomposição em Lorena - SP por MILAGRES (1988), e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725.

4.1.2) Bagaço de Cana-de-Açúcar

Foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar provenientes da Usina São Martinho, Pradópolis, São Paulo. O material foi conservado em congelador e processado com a umidade de 10%.

4.1.3) Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, com exceção da xilana (Sigma - X-0502, de "birchwood"), de grau técnico.

4.1.4) Meios de Cultura

a) Meio de Manutenção dos Fungos

O meio de cultura usado para obtenção de esporos de *P. janthinellum* e *P. chrysosporium* foi composto por 2% de glicose, 0,25% de extrato de levedura, 2% (v/v)

de solução mineral (VOGEL, 1956), e 2% de ágar-ágar sendo autoclavado por 15 minutos a 112 °C. Cada mililitro de solução mineral continha citrato de sódio dihidratado (0,125 g), fosfato monobásico de potássio (0,25 g), nitrato de amônio (0,1 g), sulfato de magnésio heptahidratado (0,1 g), cloreto de cálcio dihidratado (0,05 g), ácido cítrico (0,25 mg), sulfato de zinco heptahidratado (0,25 mg), sulfato ferroso amoniacal pentahidratado (0,05 mg), sulfato de cobre pentahidratado (0,015 mg), sulfato de manganês dihidratado (0,002 mg).

b) Meio Básico

O meio de cultura básico usado em todas as fermentações foi constituído por uma fonte de carbono (1%), extrato de levedura (0,1%) e solução salina de Vogel (2 % v/v). As fontes de carbono utilizadas foram avicel, bagaço de cana-de-açúcar, carboximetil celulose, papel de filtro ou xilana. Os meios foram distribuídos em Erlenmeyers de 125 mL, na proporção de 1:5(volume de líquido/volume do frasco) e autoclavados a 112 °C por 15 minutos.

c) Meio Formulado a Partir do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar

Para produção do hidrolisado foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São Martinho. O procedimento de hidrólise foi realizado conforme descrito por MILAGRES & LACIS (1991).

Utilizou-se 46 mg de H₂SO₄ p.a. por grama de matéria seca em uma relação de matéria seca:solução ácida de 1:10. O bagaço foi seco a 80 °C até ser atingida a umidade de 10% passando, em seguida por um moinho de facas marca Manesco & Ranieri Ltda Tipo MR 340 adaptado com peneiras de 20 "mesh" . Posteriormente, foi tratado com ácido

(20 mL de ácido sulfúrico p.a. e 8 L de água para 800 g de bagaço) e autoclavado a 121 °C por 45 minutos. A fração líquida, constituída principalmente por hemiceluloses, foi recuperada por filtração em papel de filtro e levada a pH 5,5 com NaOH 1N.

A partir do hidrolisado hemicelulósico foi preparado um meio para cultivo de *P. janthinellum* com adição de solução mineral de Vogel (2 % v/v) e extrato de levedura (0,1%). O meio foi autoclavado por 15 minutos a 112 °C.

d) Meio Para Crescimento de *P. chrysosporium*

Os cultivos foram efetuados em meio formulado com base no meio empregado por KIRK *et alii* (1986). Os componentes do meio são glicose (10,0 g/L); fosfato monobásico de potássio (2,0 g/L); sulfato de magnésio heptahidratado (0,5 g/L); tartarato de amônio (0,22 g/L); cloreto de cálcio (0,1 g/L), Tiamina (1,0 mg/mL) e 1 mL de solução de elementos traços. A composição dos elementos traços consiste em cloreto de sódio (1,00 g/L); sulfato de manganês monohidratado (0,50 g/L); sulfato de cobalto heptahidratado (0,18 g/L); sulfato zinco heptahidratado (0,18 g/L); sulfato ferroso heptahidratado (0,10 g/L); sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado (0,02 g/L) ácido bórico (0,01 g/L); Molibdato de sódio (0,01g/L) e sulfato de cobre pentahidratado (0,01 g/L).O meio com todos os componentes; exceto a tiamina, foi autoclavado a 112 °C por 15 minutos. Solução aquosa de tiamina, na concentração de 1 mg/mL, foi autoclavada separadamente nas mesmas condições e adicionada posteriormente ao meio estéril.

Álcool veratrílico foi adicionado como ativador da síntese do sistema lignolítico. Este reagente foi adicionado ao meio estéril, sob a forma de solução aquosa (12,8 mg/mL), esterilizada por filtração em placas filtrantes Millipore (0,2 µm), de forma a se obter uma concentração final de álcool veratrílico no meio igual a 67,2 mg/L (0,4 mM).

4.1.5) Enzimas Utilizadas nos Ensaios de Branqueamento

Utilizou-se as xilanases comerciais Cartazyme HS e HT, provenientes da SANDOZ e a Novozym 473, da NOVO e as não comerciais, por nós denominadas de Penjanzyme e Asperzyme. Penjanzyme foi produzida a partir do cultivo de *P. janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e Asperzyme, obtida do cultivo de *Aspergillus niger* 131 em xilana (ESPOSITO, 1993).

As ligninases foram obtidas do cultivo de *P. chrysosporium* em álcool veratrílico, conforme descrito no item 4.1.4.d.

4.2) Métodos

4.2.1) Avaliação das Atividades Enzimáticas

a) Xilanase (EC 3.2.1.8)

A atividade de xilanase extracelular foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana, de acordo com o método de BAILEY *et alii* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A solução de xilana foi preparada a partir de 1 g de xilana ("birchwood"- Sigma) diluída com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. A solução foi fervida sob agitação e o volume completado para 100 mL com o mesmo tampão.

Um volume de 0,9 mL de xilana 1 % foi colocado em tubos de ensaio e incubados em banho termostático, à temperatura de 50 °C, por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 100 µL das amostras contendo enzima. Após 5 minutos, adicionou-se 1,5 mL de DNS para dosagem dos açúcares redutores liberados, sendo a mistura aquecida

em banho de água fervente por 5 minutos. A reação foi paralisada com o esfriamento da solução em banho de gelo.

As leituras foram feitas a 540 nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-150-02). As leituras de cada amostra foram feitas calibrando o aparelho com um branco contendo os mesmos reagentes, porém a enzima foi adicionada após o reagente de DNS e imediatamente fervida, detectando-se assim, todas as unidades redutoras não provenientes da hidrólise da xilana. A curva padrão foi estabelecida a partir de xilose (Merck), nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor expresso como xilose por minuto a 50 °C.

b) β -Xilosidase (EC 3.2.1.37) e β -Glicosidase (EC 3.2.1.21)

As atividades de β -xilosidase e β -glucosidase foram determinadas segundo MURTY & CHANDRA (1991) e HARGER (1987), respectivamente. Os métodos são baseados na estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) para β -xilosidase e p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) para β -glucosidase.

Adicionou-se 100 μL de filtrado de cultura a 1 ml de solução 2 mM de pNPX, para atividade de β -xilosidase e a 1 mL de solução 2 mM de pNPG, para β -glucosidase, preparados em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. A reação foi conduzida por 15 minutos a 50 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de solução 1 M de Na_2CO_3 a fim de paralisar a reação. As leituras de absorvância foram feitas a 405 nm (espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-150-02) e o pNP liberado foi determinado pela curva padrão nas concentrações entre 50 e 350 $\mu\text{mol/mL}$.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de pNP por minuto a 50 °C.

c) Acetil Esterase (EC 3.1.1.6)

A atividade de acetil esterase foi determinada segundo BIELY *et alii* (1985). O método baseia-se na estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenilacetato.

Adicionou-se 100 μ L de filtrado de cultura a 1 mL de solução 1 mM de p-nitrofenilacetato, preparado em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5. A cinética da reação foi acompanhada durante 2 horas a 22 °C.

A curva padrão foi feita a partir de pNP conforme descrito no item 4.2.1b. Definiu-se como uma unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de pNP por minuto a 22 °C.

d) Celulases

As atividades de endo β -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) (EC 3.2.1.4) e exo β -1,4 glucanase ou avicelase (C1) (EC 3.2.1.74) foram determinadas segundo técnica descrita por TANAKA *et alii*. (1981) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 para a atividade da fração Cx e de uma suspensão a 1,1%, no mesmo tampão, de celulose microcristalina (Avicel) para C1. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático a 1 ml dos substratos e procedendo a reação a 50 °C por 60 minutos.

A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959), conforme descrito no item 4.2.1a. A curva padrão foi feita a partir de glicose (Merck), nas concentrações entre 1 e 5 μ mol/mL.

Definiu-se como uma unidade de atividade enzimática, a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto a 50 °C.

e) Atividade em Papel de Filtro (FPase)

A atividade de FPase foi determinada incubando-se tiras de papel de filtro Watman nº 1 (50 mg) com 1 mL de solução de enzima diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 a 50 °C por 60 minutos (MANDELS & REESE, 1957). A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959). A curva padrão foi feita a partir de glicose (MERCK), conforme descrito no item 4.2.1.d. Definiu-se como uma unidade de atividade enzimática, a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores expressos como glicose, por minuto a 50 °C.

f) Lignina Peroxidase

A atividade lignina peroxidase foi avaliada através da velocidade inicial de oxidação do álcool veratrílico, medida pelo aumento da absorbância do meio reacional a 310 nm (coeficiente de extinção do aldeído veratrílico a 310nm = $9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (TIEN & KIRK, 1983). A mistura reacional continha 1 ml de filtrado de cultura, álcool veratrílico 2 mM, tampão tartarato de sódio 0,1 M, pH 2,5 e peróxido de hidrogênio 0,4 mM, em um volume final de 2,5 mL. A reação conduzida à temperatura ambiente foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e monitorada a 310 nm durante 2 a 5 minutos em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV 150-02. Uma unidade de enzima oxida 1 μmol de álcool veratrílico em um minuto, sendo a atividade expressa em U/L de caldo de cultura.

4.2.2) Determinação de Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com o método de BRADFORD (1976). Este método consiste em adicionar 0,5 mL de amostra a 5 mL do reagente de

Bradford, agitar e ler a absorbância da solução a 595 nm. A concentração na amostra foi calculada pela curva de calibração com albumina bovina, nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$.

Para monitorar o conteúdo de proteínas das frações obtidas das colunas de purificação procedeu-se a determinação por análise espectrofotométrica na região do ultravioleta (GRATZER, 1976).

4.2.3) Determinação dos Açúcares

As concentrações de glicose, xilose, xilobiase e arabinose foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em cromatógrafo líquido HEWLETT PACKARD modelo HP 1082B nas seguintes condições: coluna: Aminex BIORAD HPX 87H (300 X 7,8 mm), temperatura: 45 °C, eluente: ácido sulfúrico 0,01 N, fluxo do eluente: 0,6 mL/min, volume de amostra: 20 μL , detector: índice de refração (16x).

Os açúcares totais foram determinados pelo método de Antrona, e xilose foi utilizada para construção da curva de calibração nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$ (SHIELDS & BURNETT, 1960).

4.2.4) Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada com base no proposto por PRIEM *et alii* (1991). Para medida do peso seco, todo o volume dos Erlenmeyers ou 10 mL de amostra do fermentador foram filtrados a vácuo sobre papel de filtro seco e tarado. A massa celular foi determinada após secagem em estufa a 100 °C até peso constante.

4.2.5) Fracionamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar

Um volume de 3 mL de hidrolisado hemicelulósico foi aplicado em uma coluna Sephadex G-10 (2 x 50 cm) e as frações eluídas com água destilada (17 mL/h). As frações, de 3 mL cada, foram coletadas e monitoradas quanto ao conteúdo de açúcares totais pelo método de Antrona (SHIELDS & BURNETT, 1960) e para xilose, xilobiose, arabinose e ácido acético por cromatografia líquida (HPLC), nas condições descritas no item 4.2.3. Utilizou-se como padrão uma mistura de xilose (PM 150,3), celobiose (PM 342,3) e rafinose (PM 504,5) (Apêndice I).

4.2.6) Preparo do Inóculo

As culturas de *P. janthinellum* e *P. chrysosporium* foram mantidas em meio de cultura sólido, descrito no item 4.1.4.a, à temperatura de 5 °C.

Para o preparo do inóculo uma porção de esporos foi transferida, com auxílio de alça de platina, do estoque para novos tubos. Após incubação por um período de 5 dias à temperatura de 30 °C, foi preparada uma suspensão de esporos. Os esporos foram colhidos, assepticamente, com água estéril, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. Esta suspensão foi filtrada em gase estéril e uma alíquota foi usada para contagem do número de esporos ao microscópio, utilizando-se uma câmara de Newbauer. O meio de fermentação foi inoculado com a suspensão de esporos de forma a se obter uma concentração de 10^5 esporos/mL.

4.2.7) Condições de Cultivo para Produção de Xilanase em Incubadora com Movimento Rotatório

Para produção de xilanase, os micélios foram cultivados em meio, conforme descrito no item 4.2.1b, ou à base de hidrolisado hemicelulósico. O pH inicial foi de 5,5. Os frascos (Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio) foram incubados a 30 °C sob agitação de 60 rpm por 72 horas e depois avaliou-se a atividade de xilanase. Todos os cultivos foram realizados em triplicata e com seus respectivos controles.

a) Determinação da Temperatura para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase

A temperatura ótima para crescimento de *P. janthinellum* e excreção de xilanase foi determinada em agitador recíproco com temperatura controlada nos valores de 20, 25, 30, 35 e 40°C. No tempo correspondente a 72 h de incubação, foram retirados frascos em triplicata, para determinação da concentração celular e da atividade de xilanase .

b) Determinação do pH para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase

O pH ótimo para crescimento de *P. janthinellum* e excreção de xilanase no meio de cultivo foi determinado adicionando-se ao meio de cultura solução tampão citrato/fosfato 100 mM para pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. Após inoculação do microrganismo os frascos foram incubados em agitador à temperatura de 30°C e 60 rpm. Foi feito um controle não tamponado. No tempo correspondente a 72 horas de incubação, foram retirados frascos em triplicata, para determinação da concentração celular, da atividade de

xilanase, e do valor de pH. O pH do meio foi determinado em potenciômetro Micronal, modelo B 374.

c) Determinação da Agitação para Crescimento do Fungo e Produção de Xilanase

O efeito da agitação sobre o crescimento e produção de xilanase por *P. janthinellum* foi verificado em experimentos conduzidos em agitador rotatório, a temperatura de 30 °C e agitação de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 rpm. Foi feito um cultivo sem agitação. Após um período de incubação de 72 h, determinou-se a concentração celular e a quantidade de xilanase excretada.

4.2.8) Condições de Cultivo para Produção de Xilanase em Fermentador

As fermentações foram conduzidas em fermentador New Brunswick Scientific Co. modelo Microferm com volume total de 4 L e volume útil de 2,8 L (Apêndice II).

As fermentações foram realizadas no mesmo meio descrito no item 4.1.4c, acrescido de 500 µL de antiespumante Adecanol LG-294.

A temperatura foi mantida a 30 °C, o pH inicial de 5,5, a aeração de 0,2 vvm e a agitação de 300 rpm. A cada 24 horas coletou-se 10 mL de amostra para determinação do pH, consumo de açúcar e atividade de xilanase, β-xilosidase, β-glucosidase, endo-glucanase e exo-glucanase.

4.2.9) Condições de Cultivo para Produção de Lignina Peroxidase

Os cultivos foram conduzidos em Erlenmeyers com capacidade de 125 mL, contendo 10 mL de meio líquido, descrito no item 4.1.4d. As culturas foram mantidas

estáticas, na temperatura de 38 °C por 10 dias. Após o período de crescimento todo o conteúdo dos frascos era utilizado para determinação da atividade de ligninase. Todos experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.2.10) Propriedades do Extrato Enzimático Bruto

a) Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Xilanase

O pH ótimo para atividade da xilanase foi determinado utilizando xilana ("birchwood" - Sigma) como substrato. Os tampões utilizados na concentração de 50 mM foram o acetato de sódio nos valores de pH 4,0; 5,0 e 5,5, o citrato/fosfato nos valores de pH de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,5 e 8,0 e o tampão tris-HCl nos valores de pH 7,0 e 8,0. A reação foi iniciada pela adição de enzima e a reação foi conduzida por 5 min a 50°C para determinação da atividade de xilanase.

A estabilidade do extrato enzimático em função do pH foi determinada incubando-se o filtrado de cultura em solução tampão citrato-fosfato, 50 mM, na faixa de 4,0 a 8,0. O tampão e a enzima foram deixados em contato por 24 horas em banho de gelo e após este período foram retiradas alíquotas e a atividade de xilanase analisada no pH ótimo (5,5), conforme descrito no item 4.2.1a, porém substituindo o tampão acetato por citrato/fosfato.

b) Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Xilanase

A temperatura ótima foi determinada incubando-se, durante 5 minutos, 1% de xilana ("birchwood") preparada em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 5,5 e o extrato de cultivo do fungo às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 °C. As atividades de xilanase foram determinadas em todas as temperaturas.

A estabilidade térmica de xilanases foi determinada pré-incubando o filtrado de cultivo nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C por 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após incubação, foram transferidas para banho de gelo. A atividade de xilanase foi determinada adicionando a enzima à xilana e procedendo a reação a 50°C. A estabilidade de β -xilosidase e acetil esterase foi determinada pré-incubando o filtrado de cultivo nas temperaturas de 40, 50 e 55 °C por 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após incubação, foram transferidas para banho de gelo e as atividades determinadas por adição de p-nitrofenil- β -D xilopiranosídeo a 50°C, para atividade de β -xilosidase e de p-nitrofenil-acetato a 22 ° C para a atividade de acetil esterase.

A taxa de inativação de cada enzima foi determinada pela reação de primeira ordem, obtido através das seguintes equações:

$$\log V = - \frac{k}{2,3} t + \log V_0 \text{ (I)}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,692}{k} \text{ (II)}$$

O cálculo da constante da equação (k) foi obtida a partir dos valores da inclinação da reta (K/2,3) através do gráfico semi-log da atividade enzimática pelo tempo. O tempo requerido para reduzir a atividade enzimática em 50% do valor inicial corresponde à meia vida da reação ($t_{1/2}$) e este valor é constante para reações de primeira-ordem (SEGEL, 1975).

4.2.11) Purificação de Uma Xilanase e Uma β -Xilosidase

A purificação das enzimas foi realizada a 4°C utilizando uma coluna cromatográfica contendo Sephacryl S 300 (40 x 2,6 cm), uma coluna trocadora de ânions, DEAE Sephadex - A50 (75 x 2,6cm) e uma corrida em micro escala em sistema FPLC utilizando uma coluna Mono QTM, trocadora de ânions. O procedimento para purificação está mostrado na Figura 10. Todos os tampões utilizados continham 0,01% de azida de sódio para prevenir o crescimento microbiano. As frações coletadas foram analisadas para a atividade de xilanase, β -xilosidase e conteúdo de proteína. Frações contendo essas atividades foram agrupadas.

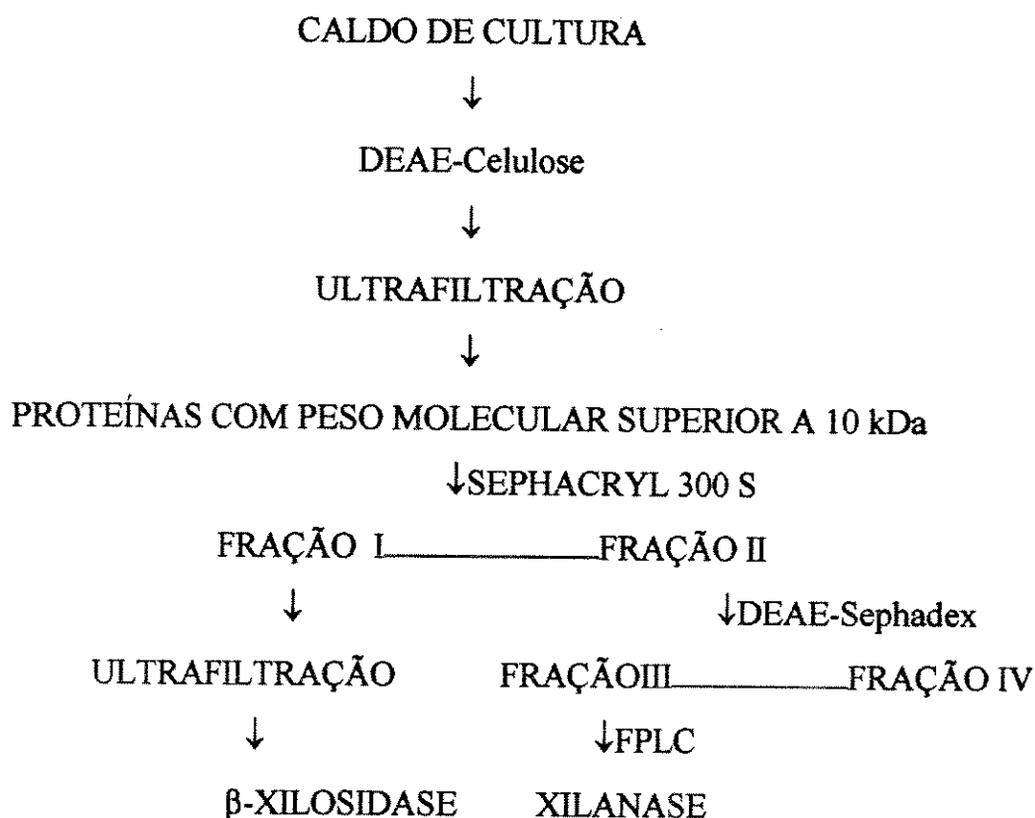


FIGURA 10. Fluxograma de Purificação de Uma Xilanase e Uma β -Xilosidase de *P. janthinellum*

Os caldos de cultura obtidos após crescimento do fungo em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em fermentador, foram utilizados nesta etapa. Os caldos ativos após 4 dias de crescimento (2500 mL do filtrado de cultura) foram filtrados lentamente sobre uma placa porosa contendo uma camada espessa de resina DEAE - Celulose, previamente tratada. O efluente obtido constituiu o extrato límpido.

O procedimento de purificação pode ser resumido em 5 passos:

- O filtrado de cultivo foi ultrafiltrado em um aparelho Minitan (MILLIPORE), contendo um conjunto de membranas que permite a passagem de substâncias de pesos moleculares inferiores a 10 kDa. O filtrado foi analisado para as atividades de xilanase e β -xilosidase e como não havia atividade foi descartado. A fração de peso molecular superior a 10 kDa foi utilizada para purificação das enzimas.

- Cinco mililitros da amostra concentrada foi aplicada numa coluna de Sephacryl 300S (PHARMACIA) (40 x 2,6 cm) previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0. A eluição da atividade se deu aplicando o mesmo tampão e coletaram-se frações de 5 mL sob um fluxo de 1,0 mL/min.

- Todas as frações com atividade de endo-xilanase foram reunidas e aplicadas em uma coluna trocadora de ânions DEAE-Sephadex (A50 - SIGMA) (2 x 50 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 20 mM, pH 5,5. A coluna foi lavada com o mesmo tampão. A enzima foi eluída aplicando-se o mesmo tampão e um gradiente de NaCl (0-0,2 M). Foram coletadas frações de 10 mL, sob um fluxo de 2 mL/min.

- As frações com atividade de xilanase foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,5. A fração que não se ligou à coluna foi aplicada em um sistema de cromatografia líquida (FPLC) (2 x 50 cm), utilizando uma coluna trocadora de ânions Mono QTM utilizando tampão piperazine 20 mM, pH 5,0, com um gradiente de NaCl 0,0 - 0,2 M.

- Algumas das frações obtidas após a cromatografia em Sephacryl 300S, com atividade de β -xilosidase foram ultrafiltradas no MINITAN, utilizando membranas com poros para passagem de substâncias de pesos moleculares inferiores a 25 kDa.

4.2.12) Estudos Eletroforéticos

a) Eletroforese em Condições Desnaturantes

A massa molecular da enzima pura foi determinada através da mobilidade eletroforética em condições desnaturantes em gel de poliácridamida 10%, contendo SDS de acordo com o método descrito por WEBER *et alii* (1972). As seguintes proteínas de massa molecular conhecida foram utilizadas como padrões: α -Lactalbumina (14,2 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa), Tripsinogênio (24 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa); Ovalbumina (45 kDa) e Albumina de soro bovino (66 kDa), Fosforilase B (97 kDa) e β -Galactosidase (116 kDa). As proteínas foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra (1 mg/mL) e 1 volume de tampão, contendo Tris (0,015 g/mL), glicerol (1 gota), SDS(0,04 g/mL), 2-mercaptoetanol (0,1 mL), azul de bromofenol (0,02 μ g/mL). As amostras foram incubadas por 5 minutos a 100 °C e aplicadas em cada cavidade. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, utilizando tampão Tris-glicina pH 8,9 contendo SDS (0,1%). O aparelho foi

calibrado para 100 V e quando a linha frontal do azul de bromofenol atingiu o gel separador, a voltagem foi aumentada para 200 V.

A coloração dos géis foi realizada durante 12 horas a 37 °C com uma solução contendo 100 mg de azul-brilhante de Coomassie em uma mistura de 45 mL de metanol, 10 ml de ácido acético glacial e 45 mL de água destilada. A descoloração foi feita com lavagens sucessivas em uma solução contendo 100 mL de ácido acético, 200 mL de metanol e 700 mL de água destilada.

b) Determinação do Ponto Isoelétrico

Os pontos isoelétricos das proteínas existentes no caldo de cultivo foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida comercialmente preparado e que continha anfólitos de pH 3 a 9. A eletroforese foi realizada em um aparelho Phast system (Pharmacia-LKB Biotechnology). Os géis foram corados com Azul de Coomassie. A partir das curvas de titulação obtidas no gel foram estimados os pontos isoelétricos das proteínas.

4.2.13) Estudo do Tempo de Hidrólise

A liberação de xilose (X_1), xilobiose (X_2) e xilotriose (X_3) foi avaliada incubando-se a xilanase purificada, numa concentração de 0,2 μ g de proteínas/mL, com 0,1% de xilana (birchwood) solubilizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida por 1 ou 24 horas. Após os períodos de incubação, as misturas de reação foram inativadas por aquecimento a 100°C por 5 minutos e então analisadas em HPLC. Monossacarídeos e oligossacarídeos foram analisados em uma coluna Aminex HPX 87P (eluente: água, fluxo: 0,5 mL/min, temperatura: 85°C).

4.2.14) Polpa

Utilizou-se para os ensaios a polpa de eucalipto, sulfato marrom (kraft), número Kappa inicial 15,6, viscosidade 31,1 cp e consistência de 18%, produzida na indústria de papel e celulose São Simão, Jacareí, S.P. Os ensaios foram feitos com a polpa como recebida apenas acertando o pH para 5,5 - 6,0 e quando mencionado para 8,0 com ácido sulfúrico 1 M.

a) Determinação de Lignina, Celulose e Hemicelulose das Polpas

A determinação de lignina foi feita pelo método ASTM (ASTM Methods, 1966). Cerca de 1,2 g de polpa previamente seca a 80 °C durante uma noite foram digeridas com 10 mL de ácido sulfúrico 72% (66,5% v/v) durante 1 hora a 30 °C , misturando continuamente com o auxílio de um bastão de vidro. A seguir a mistura foi diluída com 270 mL de água e a seguir autoclavada a 125 °C por 1 hora. Após esfriar a mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado (previamente seco e pesado) e adicionou-se água destilada até completar um volume de 500 mL. O material retido no funil foi seco a 105 °C por 2 horas e novamente pesado. O resíduo insolúvel do processo é denominado lignina.

Na fração solúvel da determinação da lignina foi determinado o teor de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência. A análise foi desenvolvida conforme descrito no item 4.2.3. Nestas condições a glicose é separada dos demais açúcares provenientes da hemicelulose (xilose, manose, galactose e arabinose). O teor de celulose foi calculado como o teor de glicose x 0,9 (fator de hidrólise) e hemicelulose como o teor de xilose x 0,88 (fator de hidrólise).

b) Tratamento Enzimático das Polpas

Utilizou-se 25 g de polpa seca para as sequências de branqueamento, exceto nos ensaios contendo oxigênio, em que se utilizou 200 g de polpa. A polpa continha consistência inicial de 18% (18 g de polpa/100 mL de água) e após adicionar o volume desejado de enzima acrescentou-se água até alcançar a consistência de 10%. A mistura de enzima e polpa foi colocada em sacos de polietileno e devidamente incubados em banho com temperatura controlada.

4.2.15) Otimização da Etapa Enzimática do Branqueamento

Procurou-se otimizar a etapa enzimática do branqueamento. Para isso foi empregado um tratamento com xilanase, seguido por uma extração com NaOH 0,1M, por 90 minutos, a 70 °C. As condições empregadas na extração alcalina foram sempre as mesmas nos 16 ensaios. As sequências de branqueamento foram conduzidas dentro de sacos de polietileno e incubados por um determinado período de tempo em um banho com temperatura controlada. Entre o tratamento enzimático e a extração alcalina as polpas foram lavadas exaustivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A partir das informações obtidas na literatura consultada (NISSEN *et alii*, 1992), escolheram-se 4 variáveis para serem estudadas: a concentração de xilanases (C); a temperatura de incubação enzima-polpa (T); o tempo de incubação enzima-polpa (t) e o pH da polpa (pH).

Para otimização das condições de tratamento das polpas Kraft com xilanases empregou-se um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Conforme determina a metodologia para este tipo de planejamento, se "n" variáveis estão envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de

experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é 2^n .

Portanto, foram necessários $2^4 = 16$ experimentos para o planejamento fatorial. Após atribuir valores para todos os níveis de cada variável (Tabela 4), montou-se um quadro representando todos os ensaios realizados com as condições experimentais (Tabela 5).

TABELA 4 - Valores Reais e Codificados Atribuídos às Variáveis

Nível	C (U/mL)	T (°C)	t (min)	pH
- 1,0	1,0	40	60	5,0
+1,0	10,0	50	180	8,0

Com os dados obtidos após a execução dos ensaios foi possível calcular os efeitos simples e de interação das variáveis sobre as respostas e determinar quais foram os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado.

Empregou-se o teste t para determinar o nível de significância de cada variável. Os valores t foram calculados dividindo-se cada efeito pela estimativa das variâncias e foram comparados ao tabelado, para 16 graus de liberdade. Em todas as análises consideradas utilizou-se um nível de significância de 95%.

TABELA 5- Matriz Especificando as Condições Experimentais de Todos os Ensaio
Executados para o Planejamento Fatorial

Experimento	Xilanase	Temperatur a	Tempo de Incubação	pH
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Os sinais "+" e "-" indicam respectivamente as seguintes variáveis:
Xilanase, 10 U/g e 1 U/g; Temperatura, 50 °C e 40 °C; Tempo de
Incubação, 180 e 60 minutos e pH 8,0 e 5,0.

4.2.16) Reflectância Difusa de Infravermelho com Transformada de Fourier

Polpas submetidas ao tratamento XE, com xilanases por 3 horas a 40 °C e posterior
extração com NaOH 0,1 M por 90 min foram submetidas à análise espectroscópica na

região do infra-vermelho. Uma amostra sem adição de xilanases foi usada como controle. Para realizar cada espectro consideraram-se as seguintes condições do aparelho:

resolução	: 4cm ⁻¹
número de varreduras("scans")	: 128
absorbância	: 0,00-1,400
frequência	: 4000-700 cm ⁻¹
referência	: barra metálica (do aparelho)

As amostras foram analisadas como obtidas após o branqueamento, sem qualquer tratamento de moagem ou mistura com KBr. Foram utilizados duplicatas de amostras e de espectros.

Para cada espectro foram selecionadas três bandas na região de frequência 1760 e 700 cm⁻¹, baseando-se nos espectros de celulose, lignina e hemicelulose de madeiras duras. As bandas obtidas são médias de 128 varreduras por cada amostra. As três bandas selecionadas foram :

cm ⁻¹	Significado
889	vibração do anel glicosídico da celulose
1425	deformação C=C do anel aromático
1593	deformação C=C do anel aromático

Foi avaliado o quociente entre as absorbâncias correspondentes a frequência da banda a 889 cm⁻¹ e as absorbâncias das outras bandas.

4.2.17) Experimentos de Branqueamento

Foram realizadas as sequências de branqueamento definidas no quadro a seguir do tipo : XE, XCED, XCEpHD, XCEoHD, LCEHD, LCEpHD, XO, OX, XOP(EOP)DP e seus controles sem adição de X ou L.

Realizou-se a extração com oxigênio, sob pressão, em um reator rotativo de aço inoxidável de 2L. O reator possuía um manômetro, um termopar e duas válvulas, uma para carregamento e outra para desgaseificação. Nos demais estágios de branqueamento foram utilizados sacos de polietileno, imersos em banho de água com temperatura controlada.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico, exceto o cloro e o dióxido de cloro. Este último foi preparado em laboratório, livre de cloro molecular, a partir de hipoclorito de sódio. Assim cada sequência de branqueamento tem uma notação e um significado a seguir:

Notação	Significado
C	Cloração
E	Extração alcalina
H	Hipocloração
D	Dióxido de cloro
P	Peróxido de hidrogênio
Ep	Extração alcalina com peróxido
Eo	Extração alcalina com oxigênio
O	Oxigênio
X	Xilanase
L	Ligninase

As polpas foram colocadas dentro dos sacos de polietileno e a cada estágio se acrescentava os reagentes e o volume de água necessário, de forma a ter a consistência desejada. As polpas foram então incubadas por determinado período de tempo nos banhos com temperatura controlada.

Para os estágios com oxigênio, foram adicionados à polpa todos os reagentes, conforme especificado na etapa. A consistência foi ajustada para o valor desejado, pela adição água e a mistura foi homogeneizada manualmente. Mediu-se o pH inicial da reação. A mistura foi transferida para o reator que foi purgado com nitrogênio, e a seguir, aquecido até atingir a temperatura desejada. Quando a temperatura da reação foi alcançada o nitrogênio foi descarregado e o oxigênio injetado no reator até obter a pressão desejada.

Após cada estágio, a polpa foi lavada exaustivamente e preparada para o próximo estágio.

Exceto onde especificado, as condições gerais de branqueamento dadas na Tabela 6 são válidas.

4.2.18) Controle dos Processos de Branqueamento

Todos os estágios de branqueamento foram controlados seguindo as normas ditadas pela TAPPI (TAPPI, 1988). Para pasta não branqueada foi avaliada a consistência, o número Kappa por titulação com KMnO_4 (Tappi T-236 os- 76) e a viscosidade pelo método do tubo capilar (TAPPI T-230 su 63).

O controle do branqueamento propriamente dito foi realizado procedendo-se as análises da água de cloro, a determinação do cloro residual, a análise da solução de hipoclorito, a determinação do dióxido de cloro em solução aquosa e peróxido em solução e residual. Todas as análises foram feitas como descrito por D'ALMEIDA, 1978.

TABELA 6: Condições Gerais de Branqueamento

Condições	X	L	C	E	EO	EP	EOP	O	D	P	H
Consistência%	10	10	4	12	12	12	12	12	12	12	12
Pressão(Mpa)	-	-	-	-	2,0	-	0,7	1,7	-	-	-
Cl ₂ (%C.A.)	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
NaOH, %	-	-	-	2,2	2,2	2,2	1,8	1,7	-	-	-
NaClO(%CA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
ClO ₂ ,%	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-
H ₂ O ₂	-	-	-	-	-	0,5	0,4	-	-	1,0	-
Temperatura (°C)	40	40	50	65	65	65	90	100	75	90	45
Tempo (min)	180	180	30	65	66	66	60	30	180	90	120
pH final	5,5	5,5	2,2	11	11	11	11	9	4	12	8,5

a) Determinação do Número Kappa

Para avaliação do número Kappa são utilizados entre 0,5 a 1,0 g de polpa seca. A amostra é desintegrada com a mão, em 10 mL de água destilada, até ficar livre dos grumos e dos feixes de fibras não dispersas. Este procedimento tem por objetivo evitar o corte excessivo das fibras, mas garantir que todas estejam separadas. Após desintegradas, as polpas são transferidas para um Erlenmeyer de 300 mL e procede-se lavagens sucessivas do recipiente com 140 mL de água destilada. A temperatura é ajustada em 25

°C. O Erlenmeyer contendo as fibras é colocado previamente no banho de temperatura constante, assegurando que a temperatura esteja $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda a reação. A suspensão deve ser agitada continuamente com auxílio de uma barra magnética até produzir um vórtice, mas controlado para não introduzir ar na mistura.

Para celulosas com baixo teor de lignina, nas quais o número Kappa está entre 2,5 e 35, pipetou-se 25 mL de solução de permanganato de potássio (KMnO_4) $0,1000 \pm 0,0005\text{ N}$ em um Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico, 4 N . Esta solução foi transferida para o Erlenmeyer com a polpa e cronometrou-se 10 minutos. O Erlenmeyer de 125 mL foi lavado, usando 50 mL de água destilada e este volume adicionado à mistura de reação.

Após 10 minutos a reação foi interrompida por adição de 5 mL de solução 1 M de Iodeto de Potássio. Titulou-se o iodo livre na suspensão com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0,1\text{ N} \pm 0,0005$ imediatamente depois da mistura, mas sem filtrar as fibras, até a solução ficar com a tonalidade amarelo claro, após o que adicionou-se duas gotas de solução de amido e continuou-se a titulação até a viragem da cor de azul para branca.

Foi feita uma determinação em branco, usando o mesmo procedimento mas sem a polpa. Neste caso a mistura deve ser titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ imediatamente.

Para calcular o valor de número Kappa utilizou-se as seguintes equações:

$$K = \frac{P \cdot x \cdot f(p)}{w} \times f(T); \quad P = \frac{(b-a) \cdot N}{0,1}$$

onde:

$f(p)$ = fator de correção do consumo de permanganato a 50%; dependendo do valor de p .
Ver Tabela (Apêndice III)

$f(T)$ = fator de correção da temperatura . Ver Tabela (Apêndice III)

w = peso em gramas da polpa seca

p = mililitros de KMnO_4 0,1 N consumido pela polpa

b = mililitros de tiosulfato consumidos pelo branco

a = mililitros de tiosulfato consumidos no ensaio

N = normalidade do tiosulfato

b) Determinação da Viscosidade

Da celulose seca, pesou-se exatamente 0,125 g e colocou-se em um frasco pequeno e com tampa e em seguida adicionou-se 25 mL de etilenodiamina cúprica, solução 0,5 M em cobre. A mistura foi agitada por 10 minutos com auxílio de uma barra magnética e transferida para a pipeta de viscosidade Fenske-Oswald, previamente aferida com óleo standard e usada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento deve ser cronometrado.

O cálculo de viscosidade da celulose em centipoises é determinado pela equação:

$$V = K \cdot t \cdot d$$

onde:

K = constante da pipeta

t = tempo de escoamento em segundos

d = densidade da solução de celulose (1,052)

V = viscosidade da celulose em centipoises

c) Determinação da Alvura

A alvura foi determinada usando um espectrofotômetro para medidas de reflectância a 457 nm (TAPPI T 414-ts). Os resultados da alvura são expressos em

porcentagem da alvura do óxido de magnésio (MgO), considerado igual a 100. A estabilidade da alvura foi avaliada após colocar a polpa ou papel em estufa a 105 °C por 3 horas , medindo-se em seguida a alvura.

d) Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade

Determinaram-se a eficiência de deslignificação e a seletividade pelas relações:

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Kappa inicial} - \text{N}^\circ \text{ Kappa final}}{\text{N}^\circ \text{ Kappa inicial}} \times 100$$

$$\text{Seletividade} = \frac{\text{Eficiência de deslignificação}}{\% \text{ de redução da viscosidade da polpa}}$$

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1)Produção de Xilanases e Celulases em Diferentes Fontes Polissacarídicas

Os resultados de atividade de xilanases e celulases obtidas por *P. janthinellum* quando cultivado em polissacarídeos provenientes de matérias-primas vegetais, apresentados na Tabela 7 demonstram que todas as fontes de carbono avaliadas induzem a atividade de xilanases. Observa-se também que a produção de celulases não foi favorecida nas condições testadas.

Verificou-se que, o substrato que melhor favoreceu a produção de xilanase foi xilana. Os resultados das atividades obtidas em hidrolisado hemicelulósico demonstram que este substrato é também um bom indutor da enzima.

Quando se substituiu a fonte de carbono xilana por bagaço de cana-de-açúcar houve uma redução de 75% nos valores da atividade de xilanase. Outros autores, também utilizaram o bagaço como fonte alternativa de substrato para produção de xilanase em frascos agitados (KESKAR, 1992; SAXENA *et alii*, 1991). KESKAR (1992), obteve as mesmas atividades xilanolíticas cultivando *Streptomyces* T7 em meio contendo bagaço ou xilana.

A capacidade de indução do bagaço pode ser atribuída ao seu componente hemicelulósico. Esta afirmativa baseia-se na baixa atividade de xilanase obtida nos experimentos sem fonte de carbono (SFC) e naqueles em que a fonte de carbono principal foi um substrato celulósico. Uma exceção foi obtida quando se utilizou papel de filtro como fonte de carbono indutora, pois neste meio detectou-se atividade de xilanases. De acordo com a sugestão de DEKKER & RICHARDS (1976), o papel de filtro contém resíduos de hemicelulose que induzem a atividade de xilanase. Outros autores atribuem este fato a um

controle único para indução de xilanases e celulases (TANGNU *et alii*, 1981; BAILEY & POUTANEN, 1989).

TABELA 7 - Atividade de Xilanases e Celulases Obtida em 96 Horas de Cultivo de *P. janthinellum* em Fontes Polissacarídicas.

Fonte de Carbono	Xilanase (U/mL)	Carboximetil-Celulase(Cx) (U/mL)	Avicelase(C1) (U/mL)	FPase (U/mL)
Xilana	120,00	0,03	0,03	0,17
Bagaço de Cana	31,11	0,00	0,08	0,04
Hidrolisado Hemicelulósico	98,48	0,08	0,00	0,00
Carboximetil Celulose	3,40	0,00	0,03	0,02
Avicel	2,10	0,00	0,03	0,01
Papel de Filtro	11,10	0,00	0,03	0,01
Sem fonte de carbono(SFC)	0,60	0,04	0,02	0,07

P. janthinellum foi incubado em meio básico contendo a fonte de carbono indicada, por um período de 96 h, a 30 °C e 150 rpm.

A maioria dos trabalhos referentes à produção de xilanase em incubadora de movimento rotatório emprega xilana comercial como substrato. A atividade de *P. janthinellum* neste

substrato foi 120 U/mL em 96 horas de cultivo, uma produção superior à de outros microrganismos. Os resultados apresentados por DUBEAU *et alii* (1987), indicaram que a atividade xilanolítica máxima obtida por *Chaetomium cellulolyticum* foi de 9,5 U/mL em meio contendo 1% de xilana. SMITH & WOOD (1991), mostraram resultados referentes à *Aspergillus awamori* onde verificou-se que o microrganismo sintetizou 18,9 U/mL de xilanase no mesmo substrato. Em um estudo envolvendo diversas cepas de fungos, *P. janthinellum* foi selecionada como a melhor produtora de xilanase extracelular. Além do mais, esta cepa apresenta a vantagem de produzir uma alta taxa de xilanase/celulase quando comparada a outros microrganismos (MILAGRES *et alii*, 1993). Este fato coloca *P. janthinellum* em posição de destaque como uma cepa promissora para processos de biopolpação por produzir baixos níveis de enzimas celulolíticas em carboximetil celulose, avicel ou papel de filtro. Segundo YANG & ERIKSSON (1992), preparações de hemicelulases com vistas a utilização em indústria de celulose e papel devem conter baixos níveis de endoglucanases, para não diminuir a resistência física das polpas.

Como destacado na introdução, o estudo da xilanase é de grande importância pela sua vasta aplicação industrial. No entanto, para viabilizar a sua produção é preciso que as enzimas sejam produzidas em larga escala. Assim, a produção de xilanase deve basear-se em substratos lignocelulósicos que não representem custos elevados ao processo. Subprodutos da transformação agrícola, por exemplo bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, são ricos em hemiceluloses e de baixo custo. O bagaço de cana-de-açúcar, acumulado em grandes quantidades nas usinas de álcool e açúcar, constitui um dos resíduos mais apropriados para produção de xilanases.

Neste trabalho, foi utilizado um hidrolisado hemicelulósico de bagaço para produção de xilanases. Conforme relatado por DEKKER (1985), em razão de sua natureza polissacarídica, o

bagaço não é diretamente utilizado por muitos microrganismos produtores de substâncias de interesse industrial, sendo necessária proceder a hidrólise dos seus componentes.

A produção de xilanase em hidrolisado hemicelulósico do bagaço foi cerca de três vezes maior que em bagaço "in natura". O perfil cromatográfico obtido quando se aplicou o hidrolisado em Sephadex G-10 (Figura 11) evidenciou a existência de três picos de açúcares. O primeiro pico (fração I) corresponde aos carboidratos de maior peso molecular, provavelmente oligômeros. Dois outros picos menores também foram obtidos, os quais foram denominados fração II e III, respectivamente ao volume de eluição. A análise das frações I, II e III por cromatografia líquida evidenciou a presença de um composto de peso molecular semelhante a rafinose na posição do pico I e de outro semelhante à celobiose no pico II. No pico III foram detectados xilose, arabinose e ácido acético. A partir destes resultados pode-se sugerir que o hidrolisado contém xilose e xilo-oligossacarídeos, principalmente xilobiose e xilotriose e que estes compostos parecem favorecer a produção de xilanase por *P. janthinellum*.

Estudos anteriores também mostraram que tanto xilose como arabinose induzem a atividade de xilanase por *P. janthinellum* (MILAGRES *et alii*, 1993). Entretanto, estes resultados diferem do obtido para *Thermoascus aurantiacus*, em que um hidrolisado hemicelulósico induziu atividades de xilanase em apenas 2% do obtido em xilana (YU *et alii*, 1987).

Estudos realizados por BIELY *et alii* (1980), mostraram que cultivando-se *Cryptococcus albidus* em xilooligossacarídeos é possível reduzir o período de tempo para iniciar a indução das xilanases. Entre os oligossacarídeos avaliados, xilobiose foi o único que não foi degradado extracelularmente e portanto parece ser este o indutor natural de xilanases. Xilobiose foi um indutor específico também para *Trichoderma reesei* (HRMOVÀ *et alii*, 1986) e *Aspergillus terreus* (HRMOVÀ *et alii*, 1991). Estes resultados sugerem que a alta produção

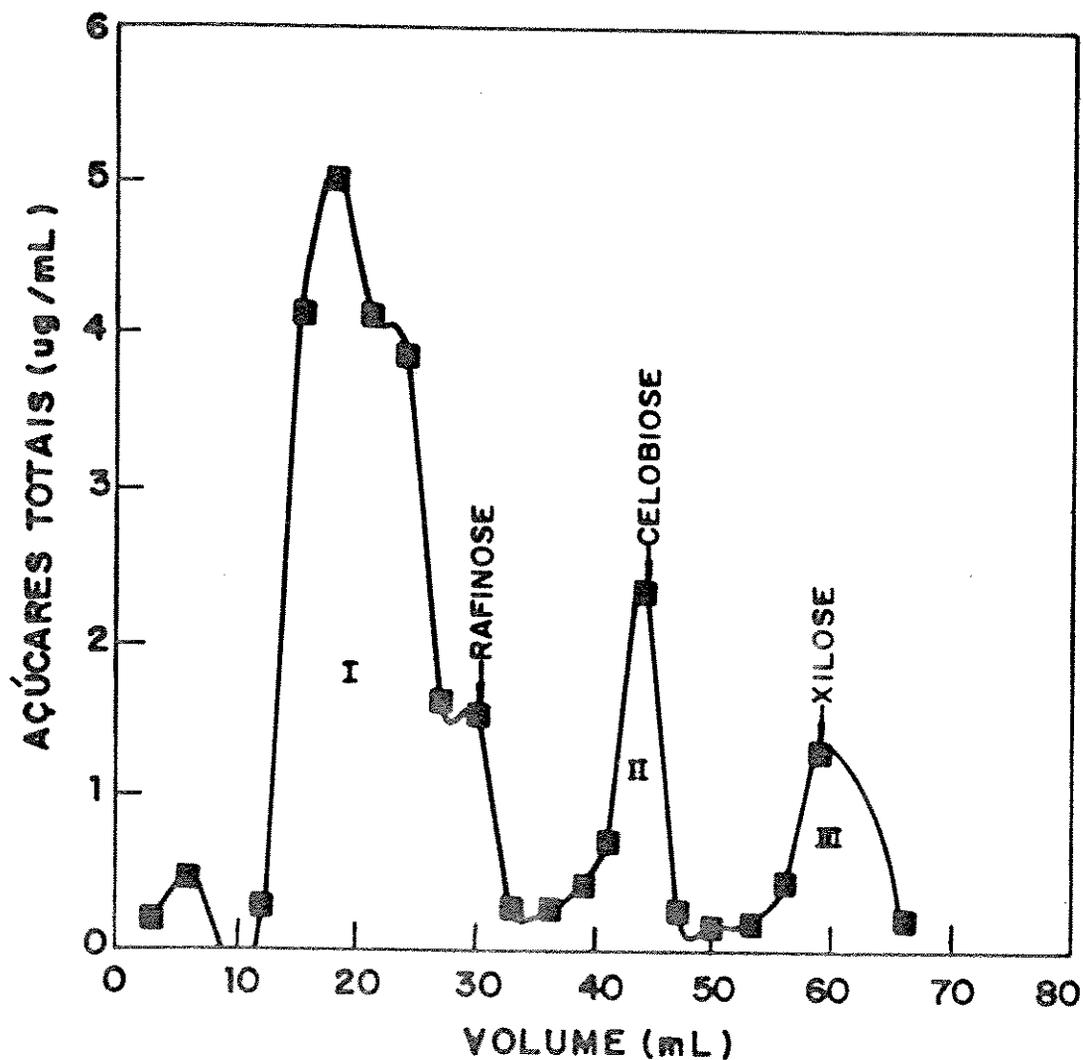


FIGURA 11 - Perfil de Eluição de Hidrolisado Hemicelulósico em Sephadex G-10.

3 mL de hidrolisado contendo 2 mg de carboidratos totais foram aplicados à coluna de Sephadex G-10 (2 x 50 cm), equilibrada em água. As frações eluídas foram analisadas quanto ao conteúdo de xilose, celobiose e rafinose por HPLC (Apêndice I) e carboidratos totais por método colorimétrico.

de xilanases de *P. janthinellum* pelo hidrolisado esteja relacionada ao mesmo mecanismo de ação descrito por BIELY *et alii* (1980), para leveduras.

5.2) Comportamento de Crescimento e Produção de Xilanase de *P. janthinellum* Cultivado em Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-Açúcar.

5.2.1) Efeito da Temperatura e pH

P. janthinellum cresceu entre a faixa de 20 a 35 °C de temperatura em 72 h, estando próxima de 30°C a temperatura ótima de crescimento (Figura 12). Segundo ALEXOPOULUS & MIMS (1979), este fungo pode ser classificado como um mesófilo.

Verificou-se que a mais alta atividade de xilanase foi obtida a 30 °C, coincidente com o crescimento máximo do fungo, portanto pode-se dizer que a produção de xilanase é associada ao crescimento celular. Tal resultado também foi descrito para *Aureobasidium pullulans* (PRIEM *et alii*, 1991) e para *Aspergillus awamori* (SMITH & WOOD, 1991). Por outro lado, VYAS *et alii* (1990) verificaram que para *Streptomyces lividans* não há coincidência entre a temperatura ótima de produção de xilanase (40 °C) e o crescimento (29 °C).

O acompanhamento do crescimento celular e atividade enzimática em fermentações a diferentes valores de pH possibilitou o estudo da influência desse parâmetro, sobre o cultivo de *P. janthinellum*, no hidrolisado hemicelulósico, conforme pode ser observado na Figura 13.

O fungo cresceu em valores de pH entre 4,0 e 8,0. A faixa de pH de 5,0 a 6,0 é ótima para produção de xilanase, porém em pH 8,0 a atividade cai drasticamente. Nesse estudo, os valores de pH que favoreceram o crescimento do fungo não coincidiram com os que permitiram uma maior produção de xilanases.

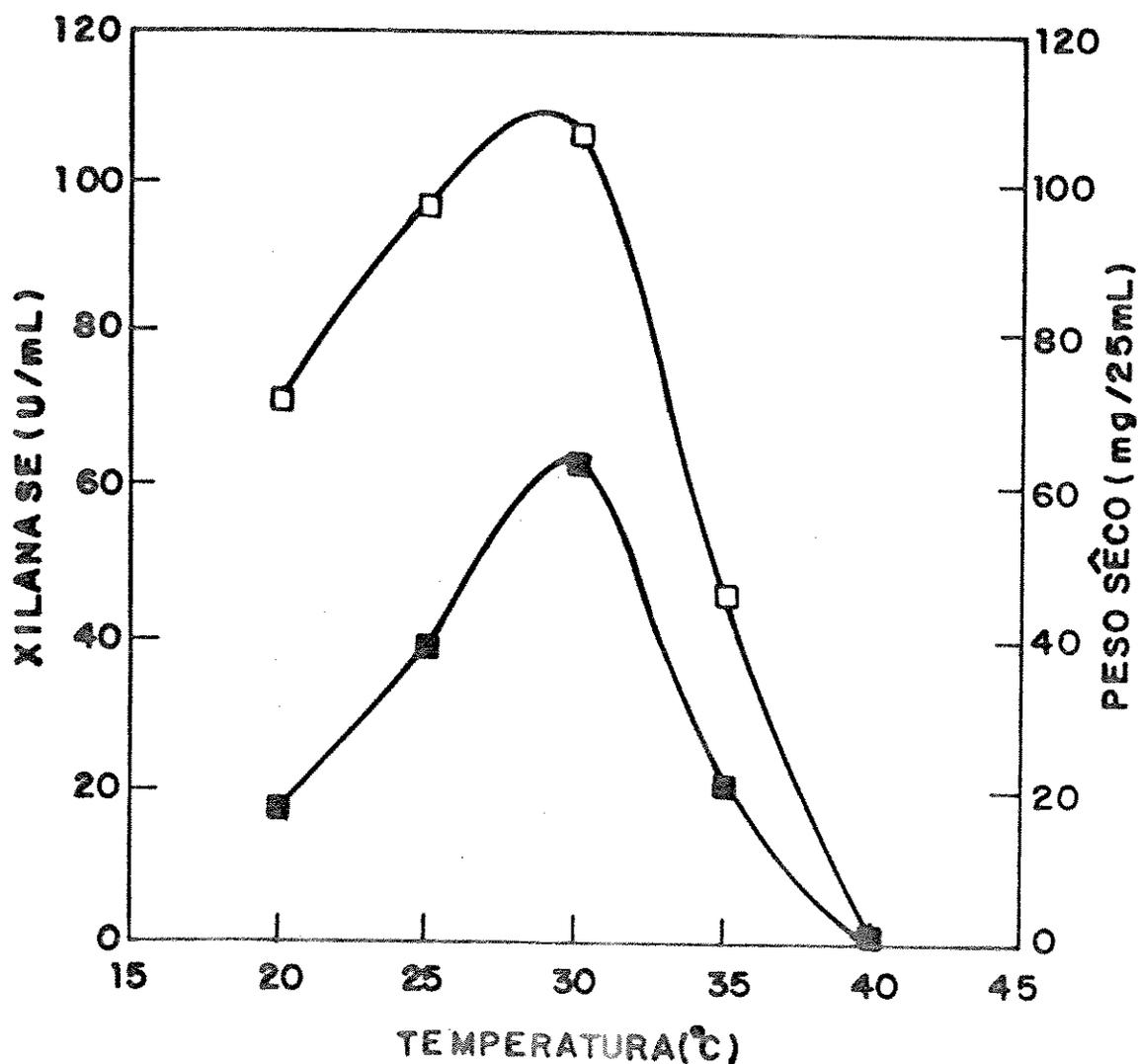


FIGURA 12. Variação da Atividade de Xilanasase (■) e do Crescimento Celular (□) com a Temperatura, Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar.

P. janthinellum foi inoculado em meio à base de hidrolisado (Material e Métodos 4.4.3) e incubado por 72 h nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40 °C na agitação de 60 rpm.

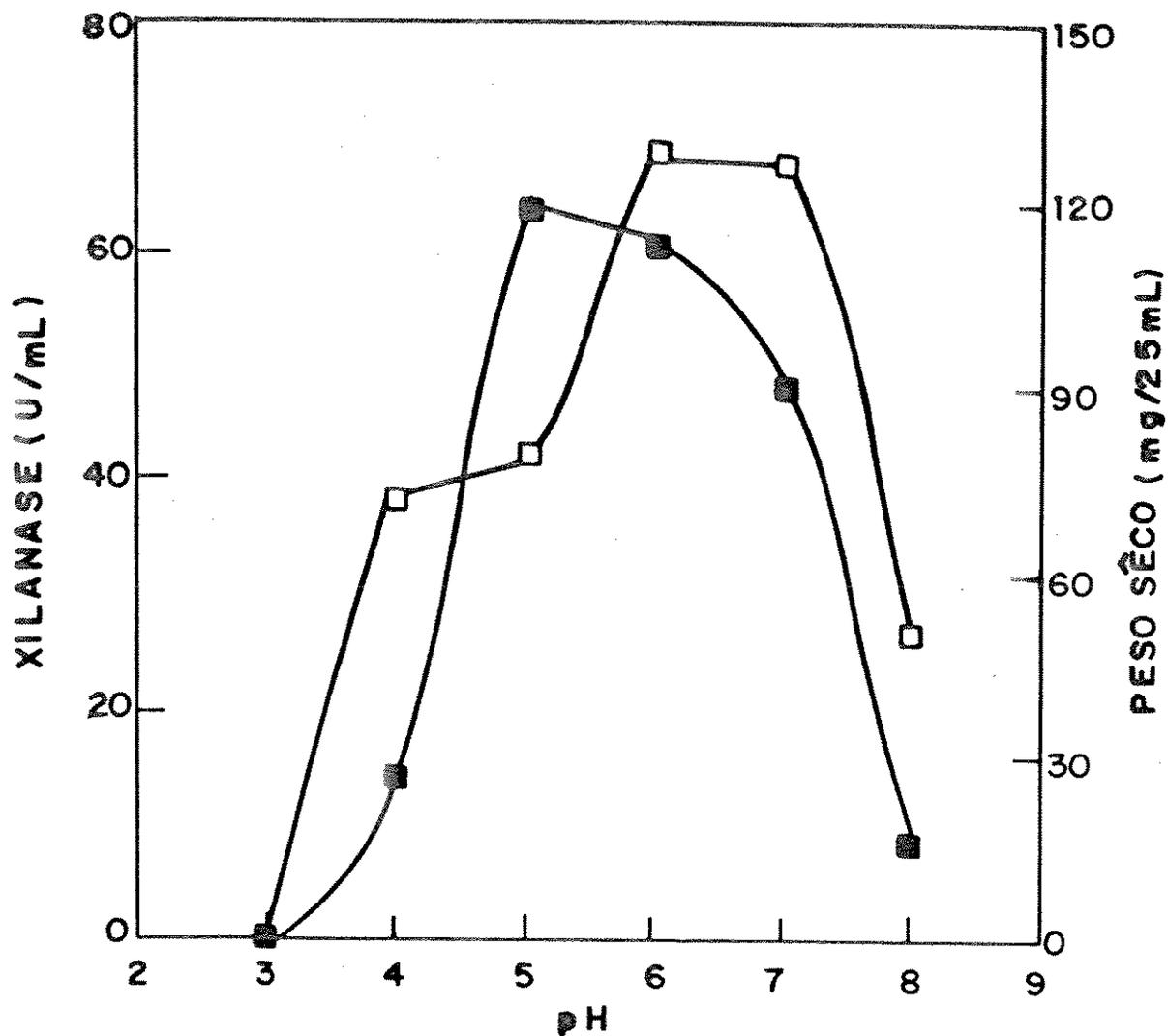


FIGURA 13. Variação da Atividade de Xilanase (■) e do Crescimento Celular (□) com o pH, Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar.

P. janthinellum foi inoculado em meio à base de hidrolisado, tamponado nos valores de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0, com tampão citrato/fosfato 100 mM e incubado por 72h a 30 °C e 60 rpm.

Resultados semelhantes foram obtidos com *P. funiculosum* (MISHRA *et alii*, 1985), e com *Thielaviopsis basicola* (GHOSH & DEB, 1988) e indicaram que o pH ótimo está em torno de 5,0 e que houve um declínio das atividades entre pH 6,0 e 7,0. Em contraste, foi mostrado que *Aspergillus fumigatus* obteve a melhor produção de xilanase abaixo de 3,5 (BAILEY & VIKARI, 1993).

5.2.2) Efeito da Agitação

A agitação é a variável mecânica mais importante para ser controlada numa fermentação em que se emprega fungos filamentosos. Segundo SIKYTA (1983), o principal problema encontrado com relação a agitação em culturas submersas é a determinação de níveis ótimos. Levando em consideração este aspecto, foi avaliado o efeito da agitação sobre a fermentação do hidrolisado hemicelulósico.

A Figura 14 mostra que a atividade de xilanase foi desfavorecida por um aumento na velocidade de agitação. Verificou-se que, nos ensaios onde foi utilizado o valor de agitação de 60 rpm, suficiente apenas para homogeneização do meio, obtiveram-se as melhores atividades enzimáticas. Alguns trabalhos de cultivo e produção enzimática enfocam este aspecto. Os resultados obtidos por RODRIGUEZ *et alii* (1991), demonstraram que a produção de xilanase foi duplicada quando a concentração de oxigênio passou de 76% para 52%. ROBINSON (1984), demonstrou que a máxima produção de xilanase por *Trichoderma reesei* em fermentador aconteceu quando o teor de oxigênio saturado foi de 50%.

Segundo MITARD & RIBA (1988), a agitação é uma variável importante a ser controlada numa fermentação em que se utiliza fungos, pois o modo de crescimento do micélio

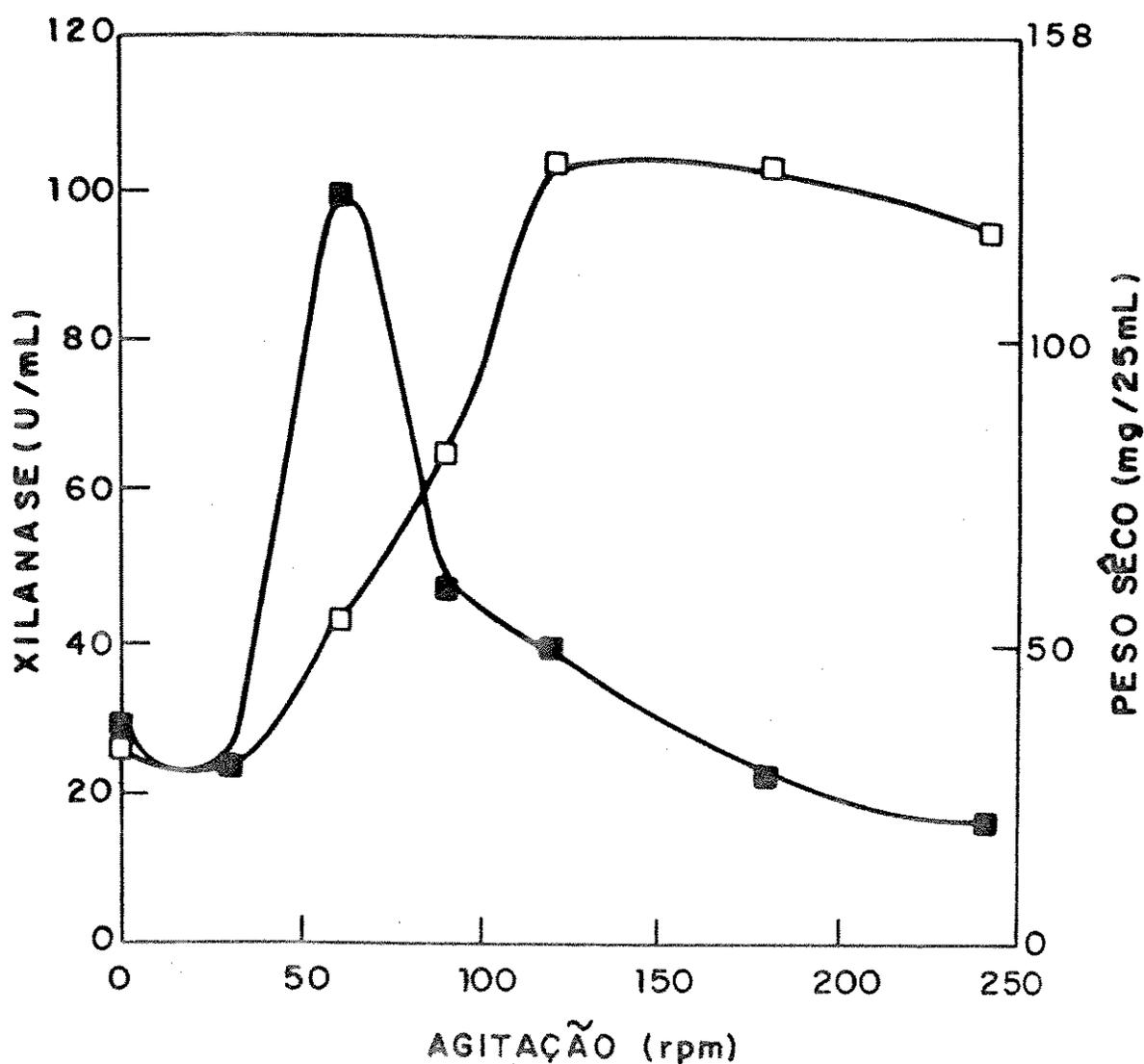


FIGURA 14. Variação da Atividade de Xilanase (■) e do Crescimento Celular (□) com a Agitação Durante a Fermentação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de- Açúcar.

P. janthinellum foi inoculado em meio à base de hidrolisado e incubado por 72 h à 30 °C nas agitações de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 rpm e em cultivo estático.

confere ao meio de fermentação uma característica de fluidos não-newtonianos. A agitação é essencial para manter os filamentos bem dispersos evitando, assim, a formação de "pellets" metabolicamente inativos.

5.2.3) Produção em Fermentador

Os resultados da Tabela 8, do experimento em fermentador, mostraram que há uma redução da atividade de xilanase quando comparados aos cultivos em incubadora de movimento rotatório. Estes resultados foram coincidentes aos obtidos por BAILEY & POUTANEN (1989),

TABELA 8- Atividade de Xilanases e Celulases Obtida em Cultivo em Fermentador.

Tempo (min)	pH	Xilanase (U/mL)	pNPXase (U/mL)	Endo-glucanase (U/mL)	Exo-glucanase (U/mL)	pNPGase (U/mL)
0	5,40	0	0	0	0	0
24	5,54	4.87	0.27	0.16	0.45	0.13
48	6.02	5.17	0.23	0.31	0.54	0.17
72	5.59	6.31	0.07	0.08	0.31	0.10
96	3.31	33.75	0.07	0.28	0.43	0.13

P. janthinellum foi cultivado em meio à base de hidrolisado hemicelulósico por 96 horas, em fermentador de 4 L contendo 2,8 L de meio. O cultivo foi agitado a 300 rpm e aerado a 0,2 vvm.

para três espécies diferentes de *Aspergillus*. Os autores mantiveram os mesmos níveis de oxigênio em frascos ou no fermentador, eliminando a possibilidade deste ser o fator de extrema diferença nos resultados. A mesma observação foi feita para a levedura *Aureobasidium pullulans*, sugerindo que o decréscimo da atividade enzimática em cultivos em fermentadores não é uma característica exclusiva de fungos (MYBURGH *et alii*, 1991).

As atividades de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase foram encontradas no extrato enzimático porém em níveis consideravelmente menores que o da xilanase. Estes resultados foram semelhantes em fermentador como em incubadora com movimento rotatório.

5.3) Propriedades do Extrato Enzimático Bruto

O extrato enzimático bruto produzido em meio líquido contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como indutor, foi analisado quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e à temperatura.

5.3.1) Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Xilanase

As atividades enzimáticas à várias temperaturas foram determinadas entre 20 e 80 °C. O efeito da temperatura na atividade de xilanase está representado na Figura 15, sendo a temperatura ótima das xilanases obtida a 50 °C.

Estudou-se a estabilidade térmica da xilanase a 30, 40 e 50 °C, da β -xilosidase e acetil esterase a 45, 50 e 55 °C (Figura 16). Para todas as temperaturas pode-se dizer que nos

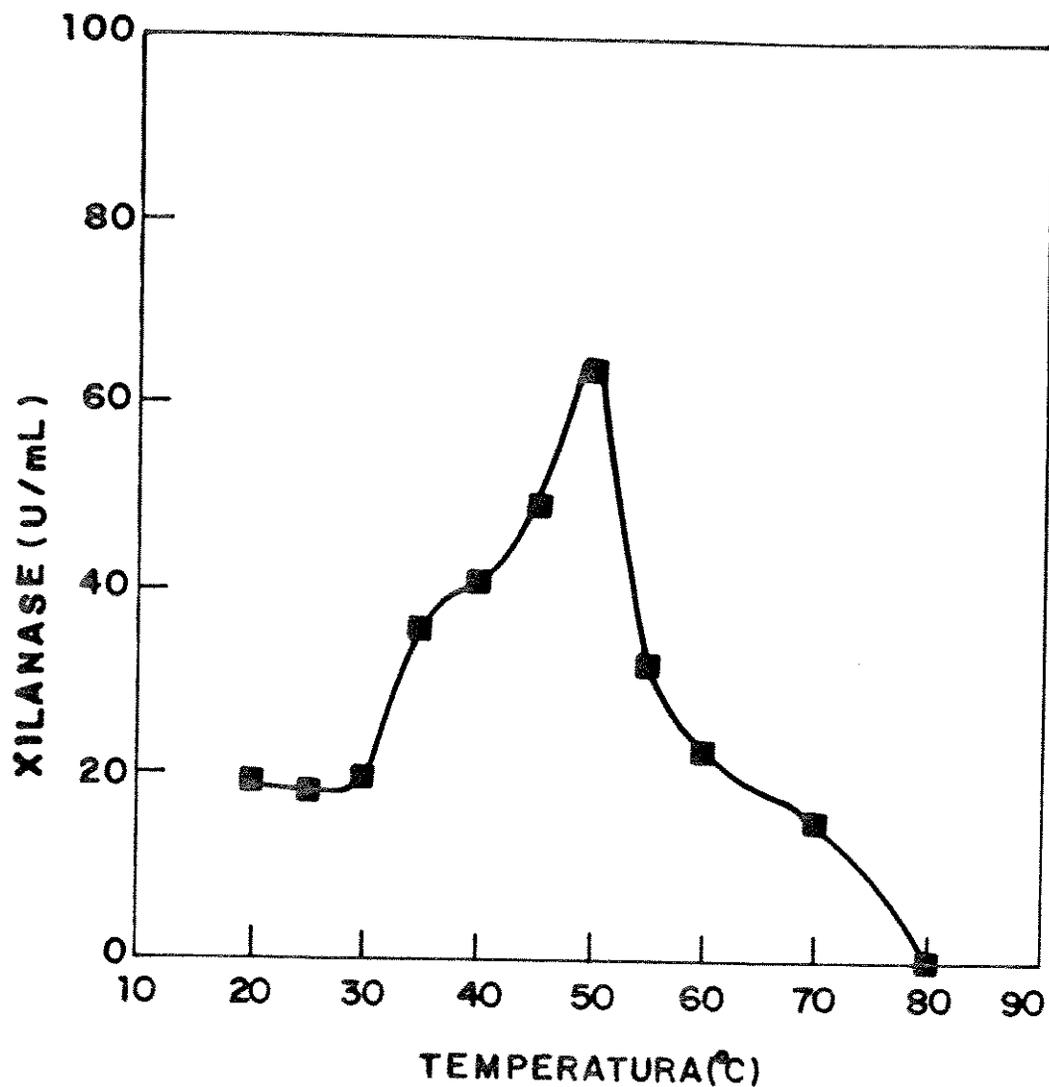


FIGURA 15. Efeito da Temperatura de Reação na Atividade de Xilanasas de *P. janthinellum*.

O extrato bruto do cultivo *P. janthinellum* em meio à base de hidrolisado foi incubado às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 °C e determinada a atividade enzimática, em xilana.

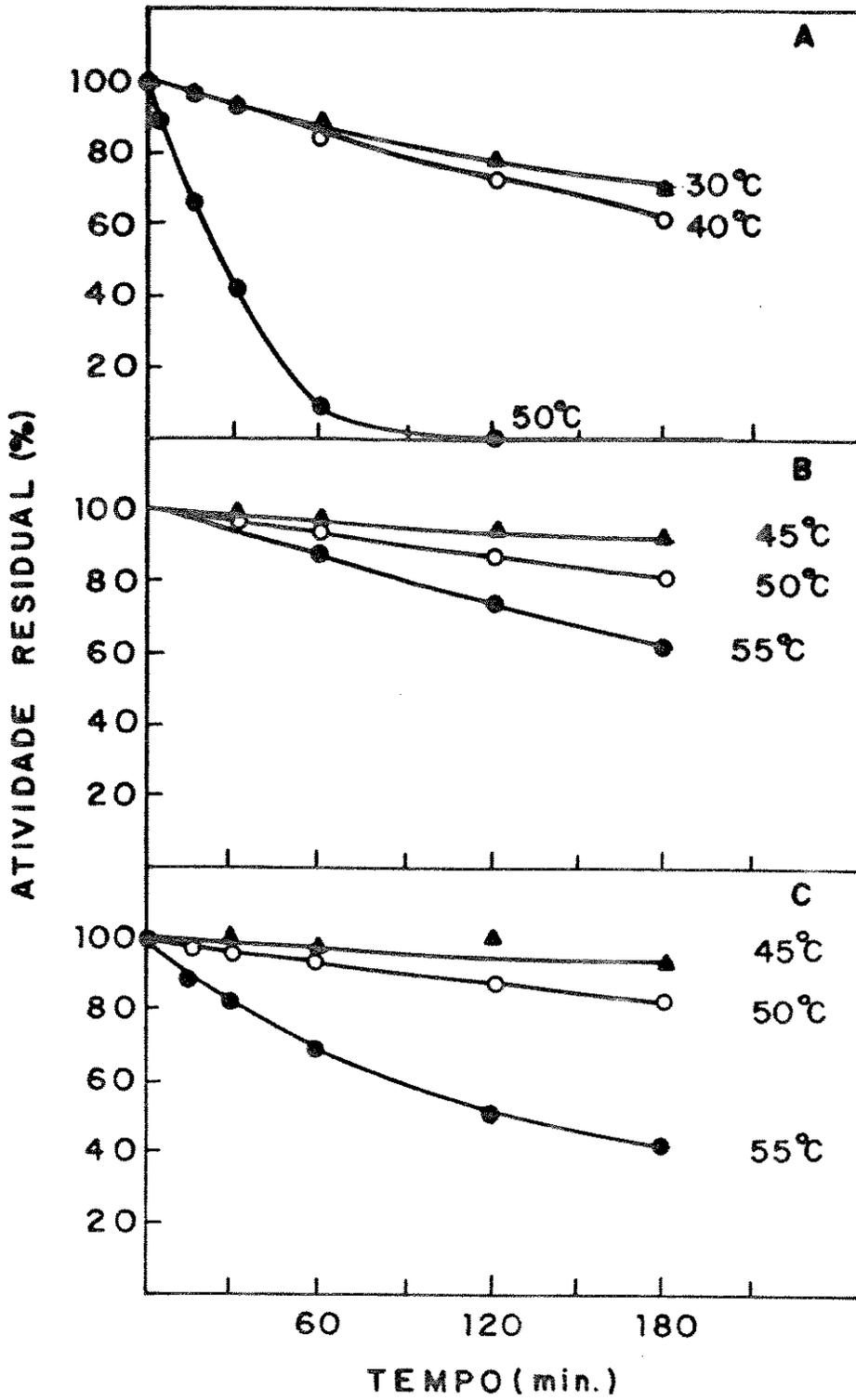


FIGURA 16. Efeito da Temperatura na Estabilidade de Xilanasas (A), β -Xilosidases (B) e Acetil Esterase (C) de *P. janthinellum*

primeiros 10 minutos as enzimas se mantêm estáveis, mas a partir daí há a diminuição das atividades sendo mais drástica com o aumento da temperatura.

Quanto à estabilidade térmica da xilanase pode-se dizer que a 50 °C é pouco estável apresentando uma meia vida de 16 minutos, entretanto nas temperaturas de 40 e 30 °C foram estáveis por 30 minutos e apresentaram meia-vida de 4 h a 40 °C e de 5,5 h a 30 °C (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de Meia-Vida Obtidos das Curvas de Estabilidade Térmica de Xilanases, β -Xilosidases e Acetil Esterases.

Enzima	Temperatura (°C)	k	t1/2 (min)
Xilanase	50	0,0414	16
	40	2,72 . 10 ⁻³	254
	30	2,02 . 10 ⁻³	340
β -Xilosidase	55	2,91 . 10 ⁻³	237
	50	1,14 . 10 ⁻³	604
	45	3,87 . 10 ⁻³	1786
Acetil esterase	55	7,17 . 10 ⁻³	135
	50	1,21 . 10 ⁻⁴	716
	45	5,56 . 10 ⁻⁴	1242

Em seguida, procurou-se avaliar a estabilidade térmica de outras enzimas que também participam da hidrólise da xilana e que possivelmente estariam presentes no extrato

enzimático de *P. janthinellum*. As atividades residuais de β -Xilosidases e acetil esterases foram avaliadas e verificou-se que as β -xilosidases apresentaram uma maior estabilidade térmica que as xilanases. Também as acetilesterases foram completamente estáveis após 3 h a 45 °C e mostraram meia-vida de 9,5 h a 50 °C. Como houve grandes diferenças nas estabilidades térmicas das enzimas pode-se dizer que há um forte indicativo de que existam pelo menos três enzimas diferentes no extrato enzimático bruto de *P. janthinellum*.

5.3.2) Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Xilanase

O estudo da influência do pH na atividade da enzima revelou que a maior atividade ocorre em uma faixa de pH entre 5,0 e 5,5 com um ponto ótimo no pH 5,5 (Figura 17). Este resultado está coerente com o pH ótimo da maioria das xilanases fúngicas descritas na literatura, porém existem fungos produtores de xilanases com pHs ótimos em torno de 3,0 (FUNAGUMA *et alii*, 1991; HASHIMOTO *et alii*, 1971; JOHN & SCHMIDT, 1988). Xilanases com pH ótimo neutro ou básico são encontrados geralmente em bactérias (HONDA *et alii*, 1985).

A estabilidade da xilanase ao pH foi analisada incubando o extrato enzimático em diferentes valores de pH, por 24 horas, e em seguida determinou-se a atividade da enzima (Figura 18). Neste estudo verificou-se que após a pré-incubação da enzima em valores de pH acima de 6,0, a atividade total medida a pH 5,5 não foi recuperada. Assim, parte do declínio da atividade acima de 6,0 resulta provavelmente da inativação irreversível da enzima. A atividade residual da xilanase foi maior nos valores de pH entre 5,0 e 6,0. Por se tratar de uma enzima de origem fúngica, pHs menores favorecem a sua estabilidade. Segundo POUTANEN *et alii* (1987) o melhor pH para estabilidade de hemicelulases provenientes dos fungos *Trichoderma*

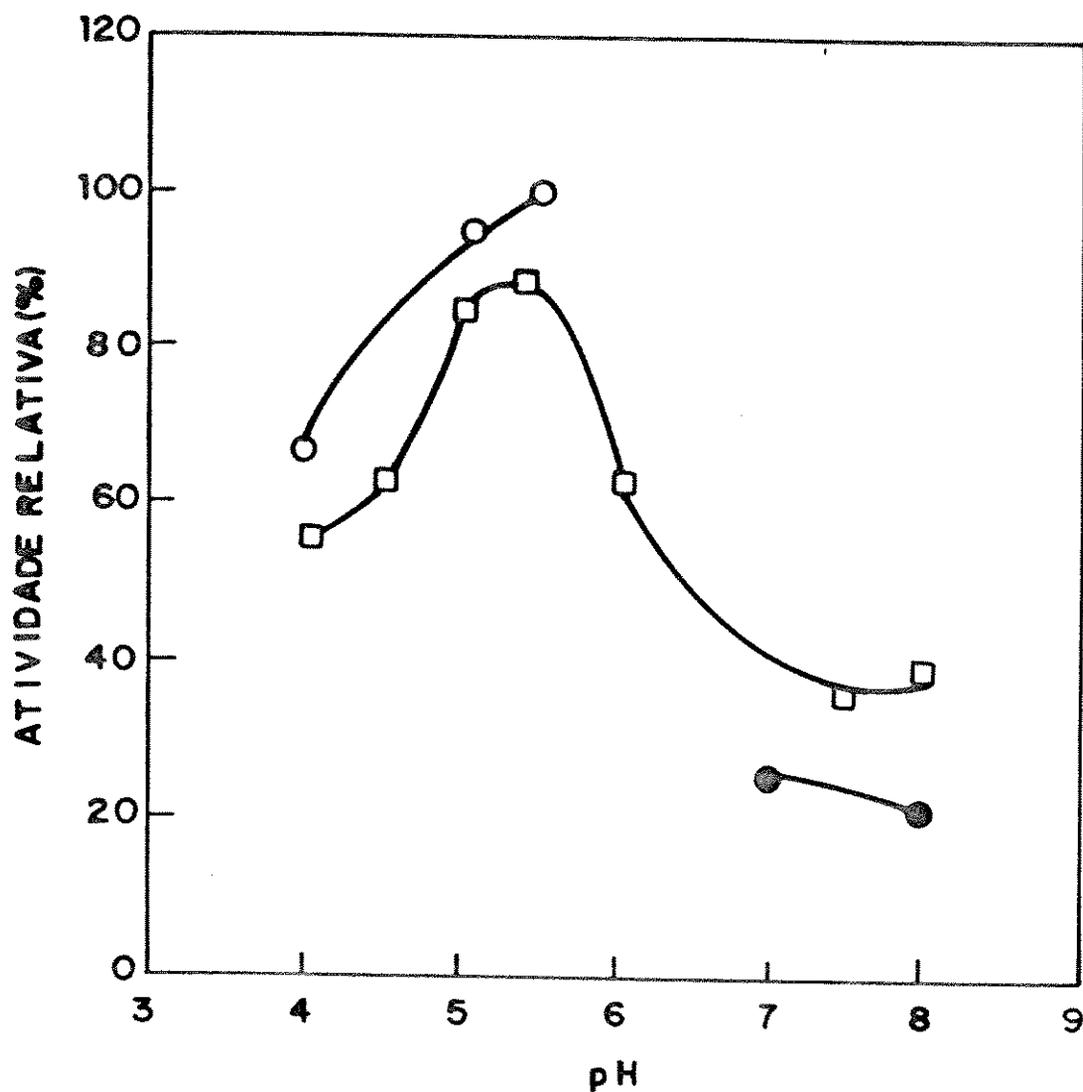


Figura 17. Efeito do pH na Atividade de Xilanases de *P. janthinellum*.

O extrato bruto do cultivo de *P. janthinellum* foi incubado a 50 °C com solução tampão citrato-fosfato (pH 4,0-8,0) (□); tampão acetato de sódio (pH 4,0-5,5) (O) e em tampão tris-HCl (pH 7,0-8,0) (●) e em seguida determinada a atividade enzimática em xilana.

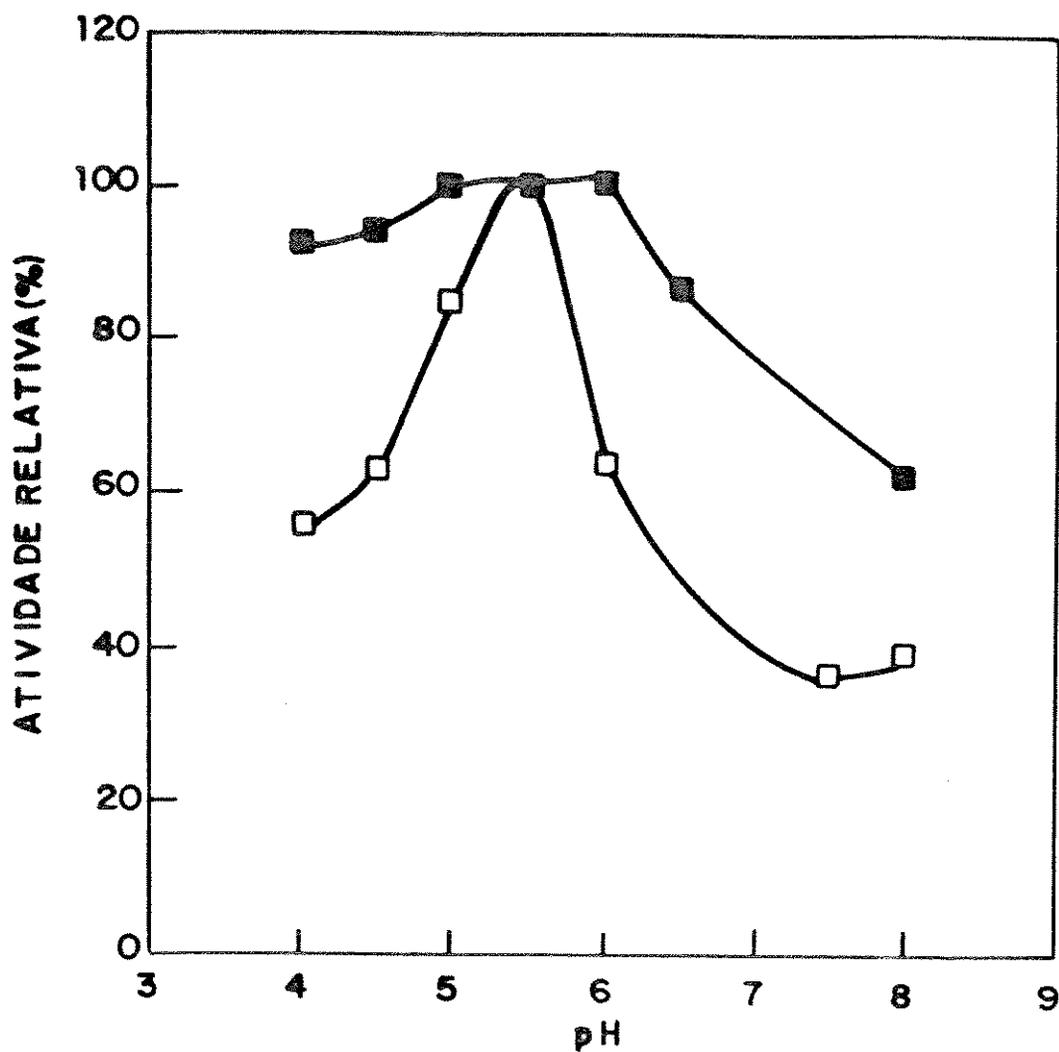


Figura 18. Efeito do pH na Atividade (□) e Estabilidade de Xilanases (■) de

P. janthinellum

A atividade da enzima foi determinada em tampão citrato fosfato (pH 4,0-8,0).

A estabilidade da enzima foi avaliada após incubação por 24 horas nos diferentes valores de pH e em seguida determinada a atividade em xilana.

reesei e *Aspergillus awamori* foi 5,5 o que coincide com o obtido por POUTANEN & SUNDBERG (1988) para *Trichoderma reesei*.

5.4) Purificação de Uma Xilanase e de Uma β -Xilosidase

Uma xilanase e uma β -xilosidase foram purificadas do caldo de cultivo de *P. janthinellum*. Durante a dessalinização da preparação enzimática na coluna Sephacryl S-300, uma fração apresentando atividade para pNPX (Fração I) foi obtida separadamente de outra contendo atividade para xilana (Fração II) (Figura 19).

As amostras com atividade para pNPX foram reunidas e em seguida, ultrafiltradas. A amostra concentrada e analisada através da eletroforese em condições desnaturantes apareceu como uma banda. Através da mobilidade eletroforética relativa, calculamos a massa molecular em 74,3 kDa (Figura 20).

A fração II foi aplicada em uma coluna de troca iônica, DEAE- Sephadex. A escolha do trocador foi baseado no ponto isoelétrico das proteínas existentes no extrato enzimático. O pI aproximado das proteínas foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo anfólitos de pH entre 3 e 9. Na Figura 21 estão representadas as curvas de titulação as quais revelaram a presença de cerca de sete proteínas na amostra original. Apenas uma dessas apresentou ponto isoelétrico entre 7,0 - 7,5. As demais apresentaram um ponto isoelétrico em torno de 4. Como as xilanases são mais estáveis em valores de pH acima de 4,0 que abaixo, optou-se por utilizar um trocador aniônico.

A cromatografia em DEAE-Sephadex (Figura 22) apresentou um pico de atividade durante a lavagem da coluna o qual é coincidente com um pico de grande concentração

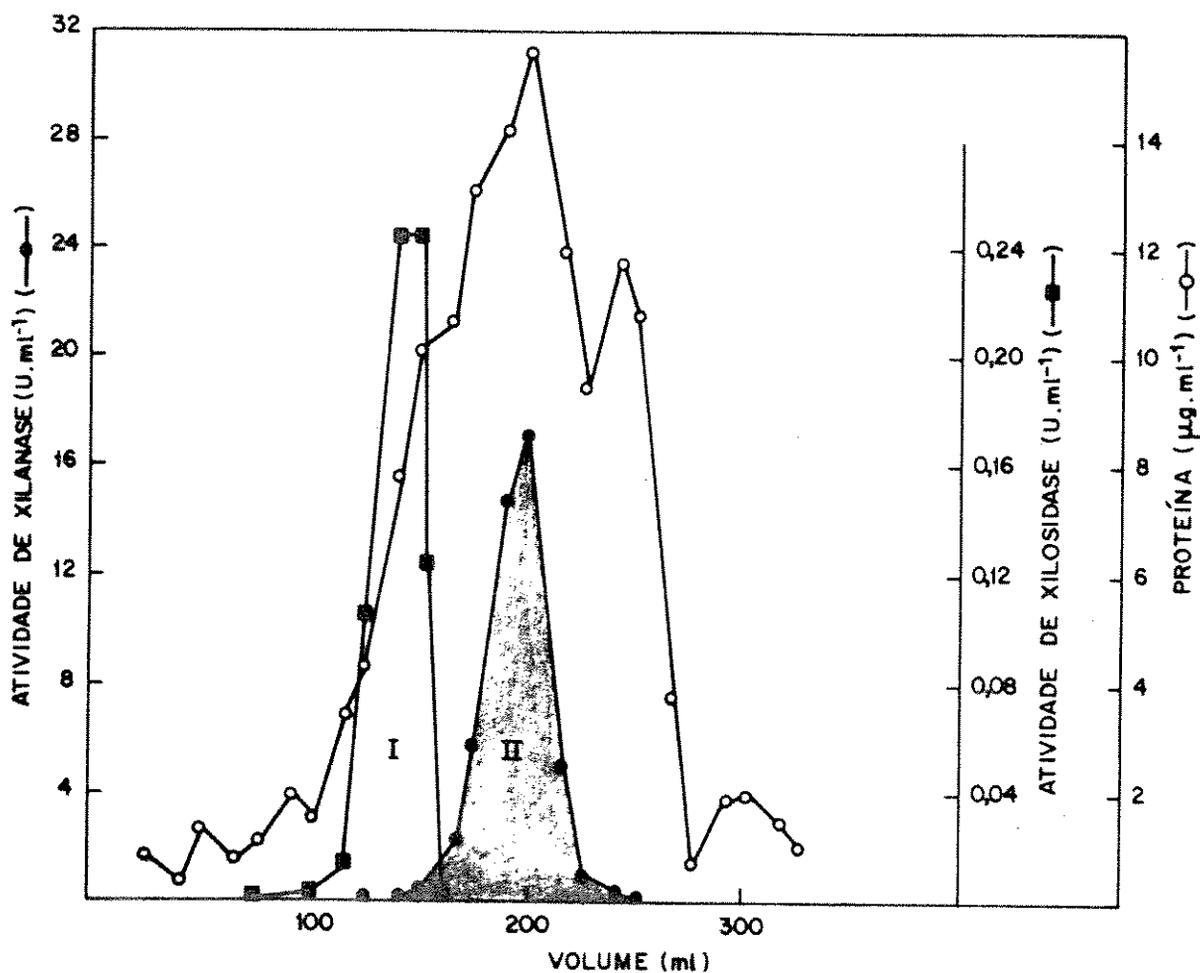


FIGURA 19. Filtração Géllica em Coluna Sephacryl 300S.

5 mL de extrato enzimático foi submetido à cromatografia em uma coluna de filtração em gel equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. A eluição foi feita com o mesmo tampão e as frações (5,0 mL) foram monitoradas para proteínas (○), Atividade de Xilanase-Fração II (●) e β-Xilosidases - Fração I (■).

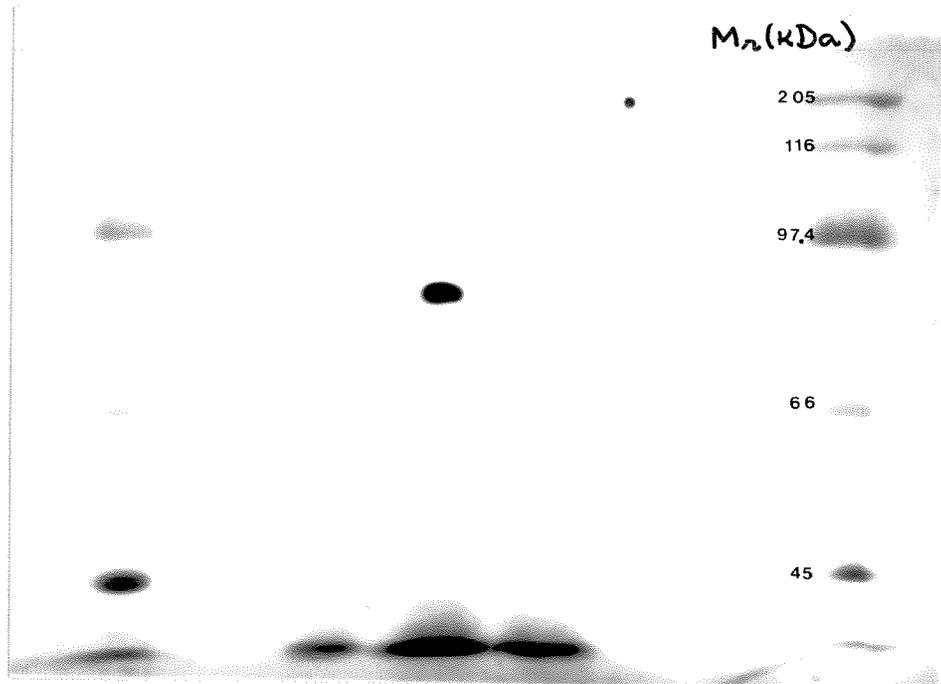


FIGURA 20. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Coletadas no Passo de Purificação de Uma β -Xilosidase de *P. janthinellum*.

Linha 1 e 5, Marcadores de Peso Molecular; Linha 3, β -Xilosidase

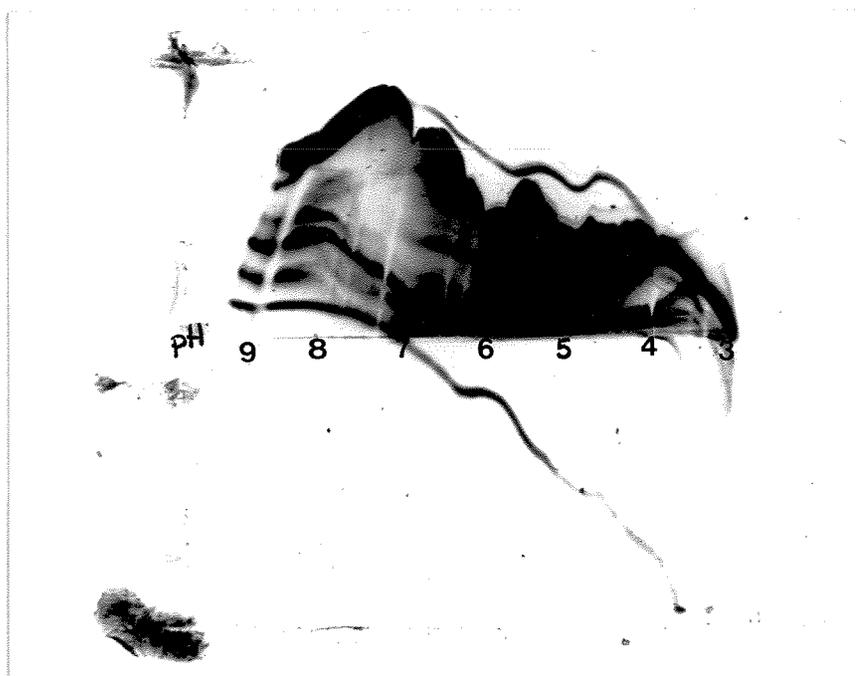


FIGURA 21. Curvas de Titulação das Proteínas Presentes no Extrato Enzimático de *P. janthinellum*

A corrida é realizada em um gel de poliacrilamida preparado comercialmente (PHARMACIA) e que contém anfólitos os quais geram um gradiente linear de pH de 3 a 9

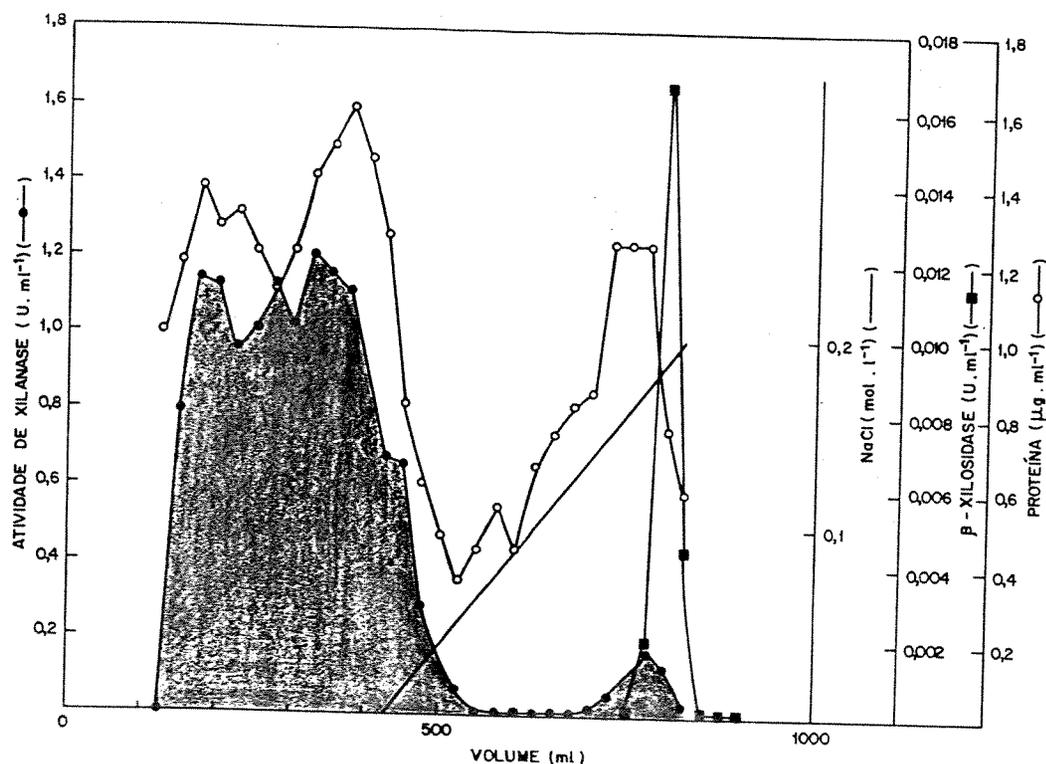


FIGURA 22. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE Sephadex A-50

A amostra com atividade apenas de xilanase foi aplicada à coluna DEAE-SEPHADEX A-50 (2 x 50 cm) equilibrada com tampão acetato 20 mM (pH 5,5). Utilizou-se o mesmo tampão para a lavagem da coluna. Um gradiente de NaCl (0 - 0,2 M) foi utilizado para eluição das frações que se ligaram à coluna. As frações (10 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteínas (○), para a Atividade de Xilanase (●) e β-Xilosidase (■)

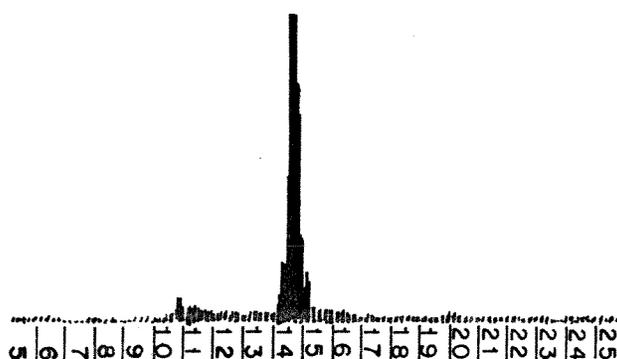


FIGURA 23. Cromatografia em FPLC da Fração que Não se Ligou à Coluna de Troca Iônica.

0,5 mL da fração I, obtida na coluna DEAE Sephadex A-50, foi aplicada em uma coluna de troca iônica (Mono Q). O conteúdo de proteínas foi monitorado pela absorvância na região do ultra-violeta.

proteica. Durante a eluição no mesmo tampão com um gradiente de NaCl outro pico de atividade de xilanase foi eluído juntamente com um pico de β -xilosidase.

A xilanase que não se ligou à coluna de troca iônica pode ser purificada utilizando uma coluna Mono Q, adaptada ao sistema cromatográfico FPLC (Figura 23).

O procedimento de purificação e os rendimentos de cada passo estão apresentados na Tabela 10 e mostram que a xilanase foi purificada cerca de 17 vezes, com uma atividade específica de 1300 U/mg e um rendimento de 48%

TABELA 10. Purificação de Uma Xilanase

Passo	Procedimento	Proteína (mg)	Enzima (U)	Rendimento da Enzima (%)	Purificação (vezes)
1	Inicial	51,1	4000	100,0	1,0
2	Filtração em Gel	12,9	4052	101,3	4,0
3	Troca Iônica	3,31	2600	65,0	10,0
4	FPLC	1,47	1920	48,0	16,7

A amostra original, as frações intermediárias e a amostra final foram comparadas em gel de poliacrilamida com SDS, 10%. Como pode ser visto na Figura 24, a amostra final (linha 2) apresentou uma banda única no gel e um peso molecular de 54 kDa.

As enzimas purificadas foram estudadas em relação às suas características físico-químicas e cinéticas. Como mostra a Tabela 11 a atividade específica da xilanase para xilana solúvel foi 1300 U/mg. O pH ótimo está entre 5,5 e 6,0 e a temperatura ótima foi 50 °C. A β -xilosidase apresentou atividade específica para pNPX de 34,1 U/mg e o pH e temperaturas ótimos de 6,0 e 60 °C, respectivamente.

A degradação de xilana (birchwood) foi estudada incubando-se a xilanase purificada por 1 ou 24 horas. Após 1 hora foram detectados arabinose, xilobiose e xiloheptose no meio de reação. Grande parte da xilana não foi solubilizada. Porém quando a enzima foi incubada por 24 horas, xilose e oligômeros intermediários foram detectados. Parte da xilana ainda permaneceu insolúvel.

TABELA 11. Características Físico-Químicas e Cinéticas da Xilanase e da β -Xilosidase Purificadas do Fluido de Cultivo de *P. janthinellum*

Característica	Endo-Xilanase I	β -Xilosidase
Atividade específica em :		
-Xilana Solúvel	1300	5,0
-pNPX	0,0	34,1
Massa molecular (KDa)	54	74,3
pH ótimo	5,5	6,0
Temperatura ótima (° C)	50	60

sugerindo que a enzima possa ter sido inibida por seus produtos. Não se observou diferenças na composição dos açúcares solúveis o que indica que essa enzima não atua em pontos específicos (Tabela 12). Comparando os produtos finais liberados pela xilanase purificada, ela pode ser classificada, segundo DEKKER & RICHARDS (1976), entre as xilanases que liberam arabinose.

Xilanases de vários microrganismos já foram isoladas e caracterizadas (JOHN *et alii* 1979; REILLY, 1981; e COMTAT, 1983). Todos os sistemas estudados contém cinco tipos diferentes de xilanases. A maioria das xilanases purificada de *Aspergillus* apresenta pesos moleculares abaixo de 32 kDa (JOHN *et alii*, 1979). O ponto isoelétrico destas enzimas varia de 3,5 a 6,7 e a temperatura ótima está entre 40 e 55 ° C.

Poucos trabalhos de purificação de xilanases foram feitos para cepas de *Penicillium*. O primeiro estudo foi realizado por TAKENISHI & TSUJISAKA (1973), que purificaram três xilanases de uma linhagem de *P. janthinellum* Biourge. EYZAGUIRRE *et alii* (1992), também purificaram uma xilanase de *P. purpurogenum* que apresentaram peso molecular 70 kDa e ponto isoelétrico 5,9. Outras duas xilanases, deste mesmo microrganismo, também foram parcialmente purificadas e apresentam pontos isoelétricos de 3,9 e 6,4, respectivamente. No entanto, não se viu publicado, em uma vasta revisão da literatura, nenhum trabalho de classificação das xilanases de *P. janthinellum* baseado em estudos dos produtos de degradação, na solubilidade dos substratos ou no ponto isoelétrico.

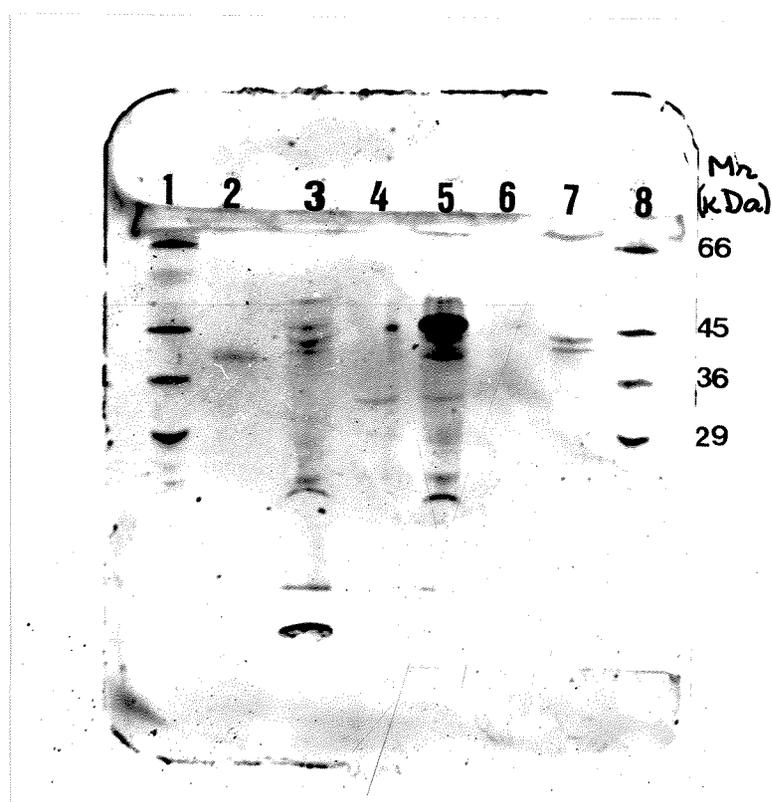


FIGURA 24. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Frações Coletadas nos Passos de Purificação de Uma Xilanase de *P. janthinellum*.

Linha 1 e 8, Marcadores de Peso Molecular; Linha 2, Xilanase; Linhas 3 e 4, Frações Coletadas na Filtração Géllica; Linhas 5 e 7, Frações Coletadas da Troca Iônica.

TABELA 12. Composição dos Açúcares Solúveis ($\mu\text{g/mL}$) Liberados da Hidrólise de Xilana por Uma Xilanase Purificada de *P. janthinellum*

Açúcares Liberados	Incubação de 1 Hora	Incubação de 24 Horas
Glicose	0	0
Arabinose	0.21	0.43
Xilose	0	4.86
Xilobiose	0.51	2.12
Xilotriose	0	3.99
Xilotetrose	0	0.54
Xilopentose	0	0.24
Xilohexose	0	0.17
Xiloheptose	0.32	0.11

5.5) Estudos de Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto por Enzimas

5.5.1) Otimização da Etapa Enzimática do Branqueamento da Polpa Kraft de Eucalipto

Geralmente, os processos de branqueamento de polpas de celulose envolvem muitas variáveis. Quando o número destas é muito grande, torna-se praticamente inviável realizar todos os experimentos necessários para estudar a influência de todas as variáveis pelos métodos tradicionais. Entretanto, escolhendo um método de planejamento adequado (como o fatorial), é possível programar os experimentos para estudar um grande número de variáveis de maneira compacta e então selecionar aquelas que são importantes para estudos mais detalhados.

A decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis, possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Permite ainda a verificação dos efeitos individuais e de interações de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo e a avaliação dos erros experimentais.

A matriz de entrada contendo as condições experimentais na forma de variáveis e respostas escolhidas, eficiência de deslignificação e seletividade, está representada na Tabela 13. Nesta tabela estão apresentadas as condições do pré-branqueamento e os resultados de viscosidade e número Kappa das polpas. As respostas dos ensaios foram dadas em termos de eficiência de deslignificação e seletividade, ambos calculado a partir dos valores de viscosidade e número Kappa conforme descrito no item 4.2.19.

TABELA 13. Otimização de Condições de Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto Utilizando Sequências Curtas (XE).

T (° C)	Enzima (U/g)	t(min)	pH	Nº Kappa	Viscosidade (cP) .	% Red. Kappa	Eficiência de Deslignificação	Seletividade
40	-	60	5,5	12,4	27,1		18,4	1,42
	1	60	5,5	11,3	26,7	8,9	25,6	1,80
	10	60	5,5	11,0	27,8	11,3	27,8	2,60
50	-	60	5,5	12,8	26,2		15,8	1,00
	1	60	5,5	10,9	26,9	14,8	28,3	2,10
	10	60	5,5	11,2	28,4	13,1	26,3	3,02
40	-	180	5,5	13,1	29,0		13,8	2,04
	1	180	5,5	10,7	28,4	18,3	29,6	3,40
	10	180	5,5	9,7	26,8	25,9	36,2	2,60
50	-	180	5,5	12,8	27,4		15,8	1,33
	1	180	5,5	11,9	28,6	7,0	24,3	3,00
	10	180	5,5	12,5	27,4	2,3	17,8	1,50
40	-	60	8,0	13,9	25,3		8,5	0,46
	1	60	8,0	13,2	25,9	5,0	13,2	0,80
	10	60	8,0	12,8	24,8	7,9	15,8	0,78
50	-	60	8,0	13,3	25,7		12,5	0,72
	1	60	8,0	11,6	24,7	12,8	23,7	1,20
	10	60	8,0	12,6	25,7	5,3	17,4	0,98
40	-	180	8,0	13,5	24,5		11,2	0,53
	1	180	8,0	14,1	24,5	0,0	7,2	0,34
	10	180	8,0	12,4	17,4	8,1	18,4	0,42
50	-	180	8,0	13,5	24,2		11,2	0,50
	1	180	8,0	12,5	23,7	7,4	17,7	0,74
	10	180	8,0	13,0	24,2	3,7	14,5	0,65

Nota-se que a xilanase reduziu o número kappa das polpas, praticamente em todas as condições. Desta forma, para escolher as melhores condições de branqueamento o primeiro passo foi introduzir os dados relativos aos ensaios 1 a 16 no programa QUIMIO para se obter os efeitos das variáveis sobre as respostas.

Na Tabela 14 estão apresentados os efeitos de eficiência de deslignificação e seletividade para a média, as variáveis simples e também para as interações entre as variáveis. A partir da análise estatística, verifica-se pelo teste t, quais as variáveis do processo que são significativas. O valor t da tabela 14 é calculado a partir de valores das variâncias dos resultados e os limites de confiança podem ser obtidos a partir dos dados de t tabelados. O valor de t para 16 valores e um nível de significância de 95% na tabela é 2,12. Valores calculados superiores a 2,12 são considerados significativos.

O valor de pH utilizado no branqueamento foi a variável que apresentou um efeito significativo nas respostas, quando considerada isoladamente. Os valores negativos obtidos para eficiência de deslignificação e seletividade indicam que um aumento no valor de pH de 5,5 para 8,0 diminui a eficiência de deslignificação e a seletividade. Em ensaios em que se utilizaram valores de pH de 8,0 a eficiência de deslignificação diminuiu por cerca de 11% e a seletividade em 1,8 unidades. Este efeito é constante para os níveis de outras variáveis testadas ou seja, o pH foi independente das outras variáveis (Tabela 14).

Existe uma interação significativa, porém negativa entre a temperatura e as variáveis, concentração de enzima e tempo de incubação no que diz respeito à eficiência de deslignificação. Os resultados da análise estatística mostraram um efeito antagônico entre elas. Isto significa que pode-se obter os mesmos níveis de deslignificação utilizando a maior temperatura associados aos valores mais baixos de tempo e concentração de enzima ou utilizando-se a temperatura mais baixa com tempo e concentração de enzima maiores.

TABELA 14- Efeito Estimado de Um Projeto Fatorial 2⁴

Efeitos	Eficiência de Deslignificação	Valor-t	Seletividade	Valor-t
Média	21,45 +/- 1,25	13,66	1,62 +/- 0,036	6,02
Xilanase	0,51 +/- 2,5	0,32	-0,10 +/- 0,072	0,37
Temperatura	-0,48 +/- 2,5	0,30	0,05 +/- 0,072	0,18
Tempo de Incubação	-1,48 +/- 2,5	0,94	-0,07 +/- 0,072	0,26
pH	-11,01 +/- 2,5	7,01*	-1,76 +/- 0,072	6,54*
Xilanases x Temperatura	-5,08 +/- 2,5	3,23*	-0,12 +/- 0,072	0,44
Xilanases x Tempo	1,51 +/- 2,5	0,96	-0,47 +/- 0,072	1,74
Xilanase x pH	0,48 +/- 2,5	0,30	-0,04 +/- 0,072	0,15
Temperatura x Tempo	-3,78 +/- 2,5	2,40*	-0,27 +/- 0,072	1,00
Temperatura x pH	5,08 +/- 2,5	3,23*	0,25 +/- 0,072	0,93
Tempo x pH	-1,51 +/- 2,5	0,96	-0,32 +/- 0,072	1,18
Xilanase x Temperatura x Tempo	-1,78 +/- 2,5	1,13	-0,09 +/- 0,072	0,33
Xilanase x Temperatura x pH	-0,81 +/- 2,5	0,51	-0,03 +/- 0,072	0,11
Xilanase x Tempo x pH	1,48 +/- 2,5	0,94	0,52 +/- 0,072	1,93
Temperatura x Tempo x pH	2,48 +/- 2,5	1,58	0,27 +/- 0,072	1,00
Xilanase x Temperatura x Tempo x pH	0,48 +/- 2,5	0,30	0,10 +/- 0,072	0,37

Efeito significativo ($t_{16,0,95} = 2,12$)

A interação entre a temperatura e pH foi significativa e positiva. É razoável acreditar que a eficiência de deslignificação não diminui a 40 °C ou 50 °C em função do pH.

Para os resultados de seletividade, não houve efeito significativo entre as interações.

Associando os benefícios trazidos pela utilização de xilanase na deslignificação e na seletividade do processo, escolheu-se como condições ótimas do branqueamento pelo planejamento fatorial o valor de pH de 5,5 e a combinação temperatura 40 °C, tempo de incubação 180 minutos e a concentração de 10 U/por grama de polpa seca. Pode-se ainda, ter os mesmos efeitos de deslignificação e seletividade na temperatura de 50 °C, tempo de 60 minutos e 1 U/por grama de polpa.

5.5.2) Reflectância Difusa de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho (DRIFT) foram obtidos de duas amostras de polpas de celulose kraft submetidas à sequência XE e duas amostras controle, polpas submetidas apenas à extração alcalina (E).

Os espectros mostram uma banda típica de celulose, a 898 cm^{-1} , várias bandas entre 950 e 1100 cm^{-1} , em parte devido a carboidratos (ligação C-O em álcoois) e de 1235 a 1605 cm^{-1} , representativos da lignina.

Os espectros apresentados na Figura 25, mostram que essas bandas são modificadas pelo tratamento com xilanases. A banda característica de lignina, 1505 cm^{-1} não aparece nos espectros das polpas, no entanto a de 1600 cm^{-1} é bastante nítida. Esta banda decresce com o tratamento com xilanases. Outra banda da região de deformação C=C do anel aromático, 1430 cm^{-1} , apresenta o mesmo comportamento da anterior.

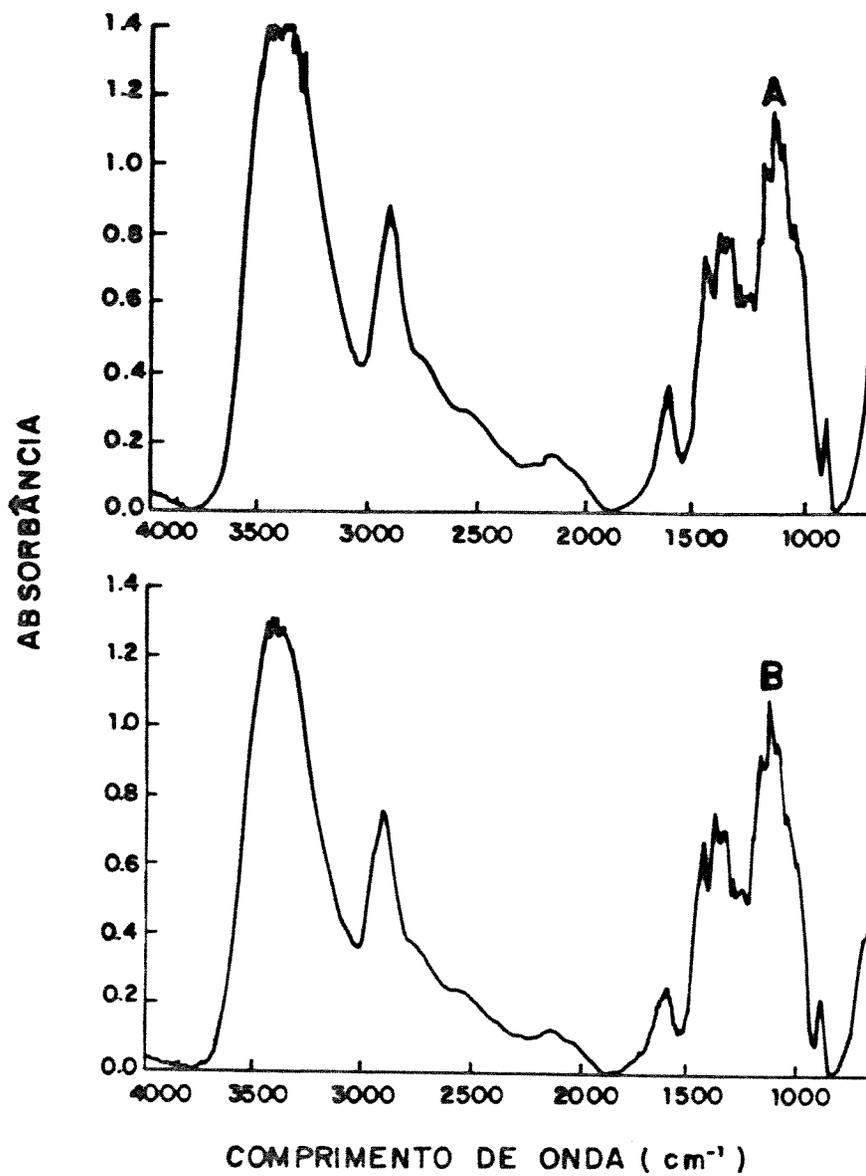


FIGURA 25. Espectros de Infra-Vermelho de Polpas Kraft Tratadas com NaOH 4% (A) e de Polpas Tratadas com Xilanases e NaOH 4% (B)

A banda a 895 cm^{-1} , atribuída à celulose, pode ser evidenciada em todos os espectros, porém a banda de hemicelulose, a 1740 cm^{-1} , presente em madeira não tratada não aparece nessas polpas.

Foi avaliada a relação entre as absorvâncias a 898 cm^{-1} e as obtidas a 1605 cm^{-1} (Tabela 15). Observou-se uma diminuição da intensidade da banda a 1605 cm^{-1} em relação às outras bandas. Isto indica que o teor da lignina nas amostras tratadas com xilanase é menor.

TABELA 15. Absorvâncias das Bandas Características do Anel Glicosídico da Celulose (A898) e do Anel Aromático da Lignina (A1430) e (A1605) de Polpas de Celulose Submetidas à Sequência XE.

Amostra	A898	A1430	A1605	A898/A1430	A898/A1605
E(1)	0,2505	0,7108	0,3444	0,3524	0,7273
	0,2856	0,7394	0,3754	0,3862	0,7608
E(2)	0,2547	0,6602	0,3319	0,4231	0,7674
	0,2474	0,7394	0,3990	0,3862	0,6216
XE(1)	0,2261	0,6868	0,2454	0,3292	0,9213
	0,2383	0,7125	0,2687	0,3344	1,127
XE(2)	0,2405	0,7034	0,2708	0,3411	0,881
	0,2523	0,7726	0,2967	0,3265	0,8503
	0,2568	0,7497	0,2957	0,3425	0,8684

5.5.3) Tratamento de Polpas com Xilanases Comerciais e de *P. janthinellum* (Penjanzyme)

As características de branqueamento observadas para Penjanzyme foram comparadas a aquelas das enzimas comerciais. Primeiramente avaliaram-se as atividades dos caldos para que se pudesse aplicar quantidades equivalentes de xilanase sobre as polpas (Tabela 16). O valor de 51,5 U/mL de xilanase obtido com a linhagem de *P. janthinellum* corresponde a determinação no extrato de cultivo, sem nenhuma etapa de concentração ou purificação.

A xilanase de *P. janthinellum* (Penjanzyme) apresentou características desejadas, igual à Novo e Cartazyme HS, quando se utilizou a concentração de enzima correspondente a 1 U/g de polpa (Tabela 17). Com exceção da Cartazyme HT, as demais xilanases aumentaram a eficiência de deslignificação das polpas.

Durante a incubação da polpa com baixas concentrações de xilanase, (1 U/g de polpa) verificou-se um aumento da viscosidade. Resultados semelhantes foram obtidos por PAICE *et alii* (1988), utilizando uma xilanase livre de celulasas. Os autores atribuíram o aumento da viscosidade à redução seletiva do conteúdo de xilana nas polpas. Como a xilana apresenta um menor grau de polimerização que a celulose a sua remoção aumentaria a viscosidade média da polpa.

Observou-se que a utilização de maiores concentrações de xilanases, de *P. janthinellum* e da Novo, não resultou em aumento na eficiência de deslignificação, mas houve um decréscimo na viscosidade (Tabela 18). Estes resultados sugerem a presença de pequenas quantidades de endoglucanase nestas preparações enzimáticas. Essa sugestão é reforçada pelo fato que a determinação de viscosidade envolve essencialmente moléculas de celulose, e portanto o decréscimo na viscosidade está associado à hidrólise da celulose e não da xilana. No entanto, segundo YANG & ERIKSSON (1992), o tratamento de polpas celulósicas com

hemicelulases contendo baixos níveis de endoglucanase aumenta a acessibilidade das enzimas, beneficiando o branqueamento sem diminuir a resistência física das polpas.

Verificou-se também que Cartazyme HS é mais específica para remoção de hemiceluloses pois mesmo utilizando-se maiores concentrações de enzima (10 U/g), ainda se obteve um aumento da viscosidade das polpas. Quanto a aplicação da Cartazyme HT, não se observou melhorias no branqueamento, podendo ser atribuído a prováveis inibidores existentes no licor de cozimento.

TABELA 16- Determinação da Atividade Xilanásica de Enzimas de Diferentes Procedências

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
Novozym 473 ^a	7,0	50	$1,00 \cdot 10^4$
Cartazyme HS ^b	4,0	50	$5,54 \cdot 10^4$
Cartazyme HT ^b	9,0	65	$3,72 \cdot 10^2$
<i>P. janthinellum</i> ^c	5,5	50	$5,15 \cdot 10^1$
<i>P. janthinellum</i> ^c	8,0	50	$1,30 \cdot 10^1$

a- Xilanase produzida pela NOVO

b-Xilanase produzida pela Sandoz

c-Xilanase obtida do cultivo de *P. janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço.

TABELA 17- Pré-branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto Utilizando Xilanases (1 U/g), Seguida por Extração Alcalina (XE).

Xilanases	Viscosidade (cP)	Número Kappa	Eficiência de deslignificação	Seletividade
-	25,9	10,7	29,6	1,8
Novo	28,0	10,0	34,2	3,4
Cartazyme HS	27,2	9,5	37,5	3,0
Cartazyme HT	24,9	11,0	27,6	1,4
P. janthinellum	26,9	9,4	38,2	2,8

Referência - Número Kappa = 15,2 e Viscosidade = 31,1

TABELA 18- Pré-branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto Utilizando Xilanases (10 U/g) Seguida por Extração Alcalina (XE).

Xilanases	Viscosidade (cP)	Número kappa	Eficiência de deslignificação	Seletividade
-	25,9	10,7	29,6	1,8
Novo	25,4	9,6	36,8	1,6
Cartazyme HS	27,0	8,7	42,7	3,2
Catazyme HT	27,2	11,3	25,6	2,0
P. janthinellum	24,9	9,5	37,5	1,9

Referência - Número Kappa = 15,2 e Viscosidade = 31,1

5.5.4) Redução de Produtos Clorados Durante o Branqueamento

Uma vez que a xilanase produzida por *P. janthinellum* provou ser tão eficiente na redução do número kappa quanto as enzimas comerciais, procurou-se avaliar a redução máxima possível na dosagem de cloro molecular durante o estágio C, através da introdução de diferentes concentrações de xilanase (Tabela 19).

Não houve um efeito marcante da concentração de xilanase sobre o número Kappa, por outro lado se observou um ganho na alvura, mais pronunciado nos ensaios com menor teor de cloro. De uma maneira geral, a viscosidade reduziu com o aumento da concentração enzimática, podendo este feito ser melhor observado para maiores teores de cloro. Segundo PAICE *et alii* (1992), a utilização de altas concentrações de enzima pode favorecer o ataque à celulose pelo cloro.

Os resultados obtidos nas sequências em que se utilizaram 1 U de xilanase/grama de polpa (X1CED) indicam que pode-se reduzir em até 25% o teor de cloro molecular ainda se obter uma alvura acima de 80 %ISO, que é aceitável para fabricação de papel. Nos ensaios com 1U de xilanase/g de polpa (X1CED) obteve-se em média 2% de aumento na alvura e uma redução de 5% na viscosidade, em relação à sequência controle (CED). Um aumento na concentração de xilanase para 10 (X10CED) ou 20 U/g (X20CED), possibilitou uma diminuição da concentração de cloro para 50% do valor inicial, mantendo a mesma alvura (Figura 26).

PAICE *et alii* (1988), também verificaram que em todas as sequências em que se utilizaram xilanases houve um aumento da alvura das polpas. Outros benefícios associados à utilização de xilanases em branqueamentos são o aumento do grau de inchamento e fibrilação (NOE *et alii*, 1986). Essas melhorias são devidas a redução do peso molecular de xilana durante a hidrólise e a conseqüente produção de terminais redutores. Com isso, há um aumento de

**TABELA 19- Semi-branqueamento de Polpa Kraft de Eucalipto em Concentrações
Decrescentes de Cloro Gasoso (Cl₂)**

Sequência	Reagentes		Alvura (ISO)	Amarelecimento(%)	Número Kappa	Viscosidade
	X	Cl ₂				
CED	-	3,0	83,6	8,6	1,5	15,83
	-	2,2	80,8	8,9	1,5	15,98
	-	1,5	78,2	13,2	2,2	17,69
	-	-	67,5	20,2	4,6	18,89
X1CED	1	3,0	84,6	8,1	1,3	14,72
	1	2,2	82,7	7,9	1,4	17,88
	1	1,5	80,0	11,3	1,7	17,17
	1	-	68,5	18,5	4,3	18,03
X10CED	10	3,0	85,5	8,1	1,5	14,50
	10	2,2	83,8	8,7	1,5	14,40
	10	1,5	82,7	9,9	1,8	15,48
	10	-	69,4	18,4	4,4	16,90
X20CED	20	3,0	84,9	7,7	1,6	12,98
	20	2,2	82,6	9,5	1,5	14,52
	20	1,5	82,6	9,6	2,3	13,70
	20	-	71,6	18,0	4,6	19,26

X1 - 1 U de xilanase/ g polpa seca; X10 - 10 U de xilanase/g polpa seca; X20 - 20 U de xilanase/ g polpa seca

Cl₂- Cloro (g/100g de polpa seca)

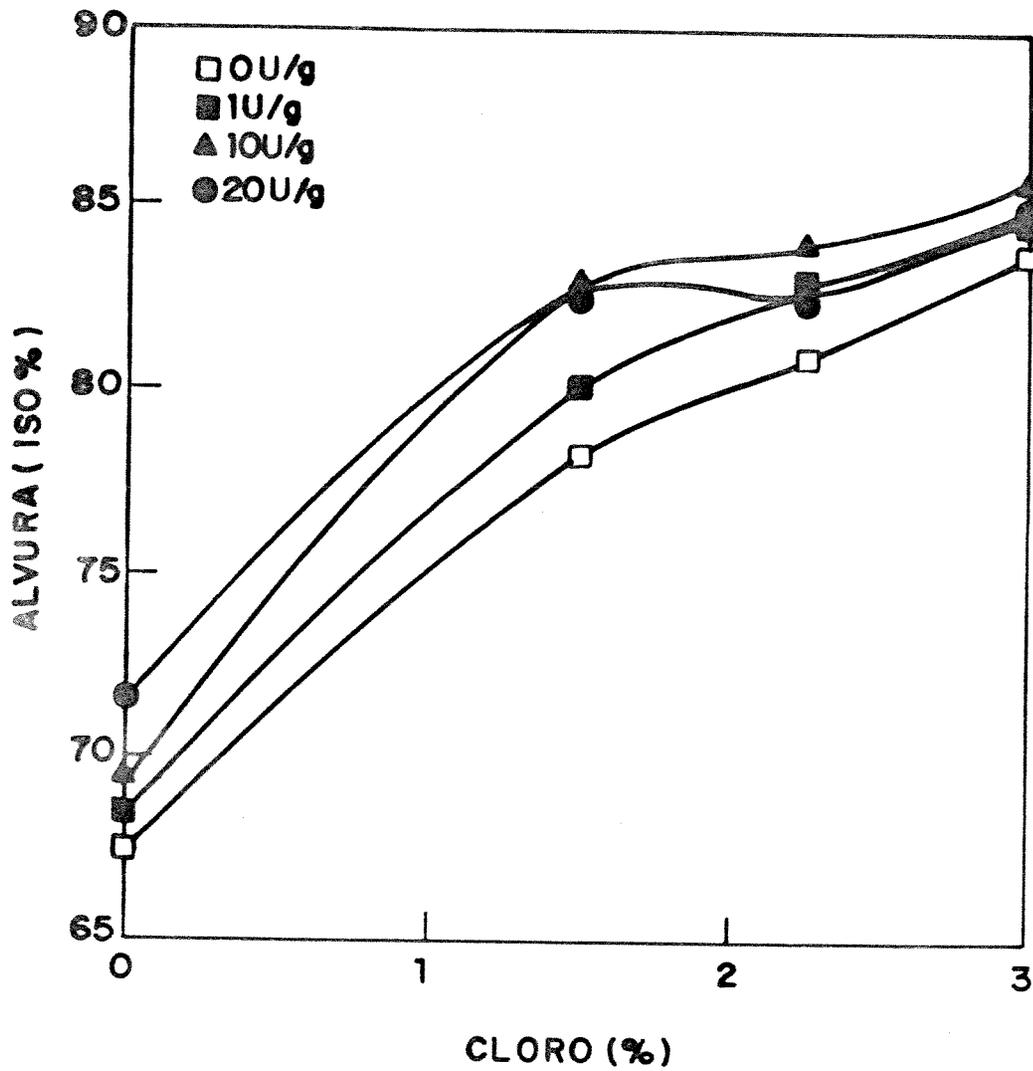


FIGURA 26. Efeito da Concentração de Cloro e de Xilanase na Alvura de Polpas Kraft Submetidas à Sequência CED

produtos de hidrólise altamente hidrofílicos dentro da parede celular, o que aumenta a acessibilidade da água e o grau de inchamento.

Diante desses fatos algumas indústrias de celulose estão modificando completamente o processo de produção de polpas. Vários procedimentos podem ser realizados visando melhorar a qualidade da polpa sem causar problemas ambientais. Porém grandes mudanças no processo requerem um alto investimento de implantação e treinamento de pessoal. Fábricas de médio e pequeno porte poderiam melhorar a qualidade de seu efluente sem prejuízo da qualidade da polpa adicionando-se xilanase após o cozimento e reduzindo o teor de cloro em até 25%. Estudos econômicos realizados por VIKARI *et alii*, (1991) mostraram que até o momento, pode-se utilizar xilanases em níveis até 10 U por grama de polpa sem onerar o processo.

A xilanase de *P. janthinellum* também foi avaliada em sequências clássicas da indústria de celulose e papel, adicionando-se 25% a menos de cloro molecular. Na Tabela 20 são apresentados os resultados referentes ao consumo de reagentes, alvura, número Kappa e viscosidade. A partir dos valores obtidos verificou-se que as maiores alvuras foram de polpas tratadas com xilanase e extração alcalina simples (XCEHD), mas paralelamente obteve-se uma polpa com baixa viscosidade. Estes fatos podem ser explicados pelo fato da polpa ter entrado no estágio de dioxidação já apreciavelmente purificada, e provavelmente a celulose ficou mais sujeita ao ataque dos outros agentes químicos. Essa evidência é reforçada pelo consumo de apenas 61% do hipoclorito de sódio.

As sequências em que se utilizaram a extração alcalina com oxigênio ou peróxido de hidrogênio levaram a menores valores de número Kappa. Em relação à sequência CEHD as reduções no número Kappa foram de 7,2% para a sequência XCE_PHD e 10,5% para a XCE_OHD.

TABELA 20 - Efeito de Xilanases na Deslignificação da Polpa Kraft, Utilizando 25% a Menos de Cloro Molecular.

Sequência	Consumo de reagente	Alvura	Número Kappa	% Redução Kappa	Viscosidade (cP)	Seletividade
C	99,7	36,8	-	-	-	-
E	-	41,5	3,8	75,0	-	-
H	99,0	71,8	-	-	-	-
D	99,5	81,3	-	-	18,1	1,8
X	-	-	-	-	-	-
C	99,1	39,7	-	-	-	-
E	-	47,6	3,3	78,3	-	-
H	61,4	81,0	-	-	-	-
D	96,4	88,9	-	-	14,9	1,5
X	-	-	-	-	-	-
C	99,1	39,7	-	-	-	-
Ep	-	59,7	2,2	85,5	-	-
H	82,5	77,5	-	-	-	-
D	97,4	87,3	-	-	17,1	1,9
X	-	-	-	-	-	-
C	99,1	39,7	-	-	-	-
Eo	-	50,0	2,7	82,2	-	-
H	72,7	79,2	-	-	-	-
D	97,2	87,9	-	-	17,8	1,9

Um experimento semelhante ao anterior foi realizado empregando as ligninases produzidas por *P. chrysosporium* em vez de xilanases. Nesse caso verificou-se que as polpas kraft de eucalipto tratadas com ligninases apresentaram um aumento do número Kappa e dos valores de viscosidade, em relação ao tratamento de referência (Tabela 21). Resultados semelhantes foram descritos por VIIKARI *et alii* (1986); (1987), porém a matéria prima foi polpa kraft de pinus. Nestes estudos os autores concluíram que as ligninases podem promover a polimerização de lignina em vez de degradá-la, tornando a polpa ainda mais escura. Estas evidências são reforçadas quando se avalia os resultados negativos obtidos em ensaios com lignina peroxidase de *Trametes versicolor* em polpas kraft produzida a partir de madeira dura (ARCHIBALD, 1992). No entanto, FARRELL (1984) verificou que algumas misturas de enzimas lignolíticas, na presença de peróxido de hidrogênio e manganês, removem lignina de algumas polpas kraft, mas não de todas.

Resultados de alvura mostram que novamente os maiores valores de brilho correspondem às polpas tratadas com xilanases, no entanto em alguns ensaios não há uma relação direta entre o aumento do brilho e a redução do número Kappa.

Nos ensaios com a xilanase e adição de peróxido ou oxigênio não se observou melhoras no brilho das polpas. Quando se utilizou ligninases obteve-se baixos valores de alvura e após adição de peróxido conseguiu-se índices equivalentes apenas à referência.

VIIKARI *et alii* (1986), mostraram que combinando-se xilanases e ligninases poderia-se obter um efeito levemente positivo na redução do número kappa das polpas kraft de pinus. Tal resultado é semelhante ao obtido na Tabela 22, em que se utilizaram xilanases de *P. janthinellum* e ligninases de *P. chrysosporium*. Estes resultados sugerem que a teoria de VIIKARI *et alii* (1987), sobre a dificuldade de penetração de agentes químicos na polpa em razão da xilana que reprecipita sobre a lignina, talvez seja a mais correta. Ou seja, primeiramente a xilanase hidrolisaria a camada de xilana sobre a polpa, e poros suficientemente

grandes seriam formados que facilitariam o acesso da ligninase. Porém outros estudos dessa natureza necessitariam ser realizados de forma a otimizar as condições para atuação da ligninase.

TABELA 21. Efeito de Ligninases na Deslignificação de Polpa Kraft, Utilizando 25% a Menos de Cloro Molecular

Sequência	Consumo de Reagente	Alvura (% ISO)	Número Kappa	% Redução do Kappa	Viscosidade (cP)	Seletividade
C	99,7	36,8	-	-	-	-
E	-	41,5	3,8	75,0	-	-
H	99,0	71,8	-	-	-	-
D	99,5	81,3	-	-	18,1	1,8
L	-	-	-	-	-	-
C	99,7	33,0	-	-	-	-
E	-	39,8	5,6	63,1	-	-
H	98,7	61,9	-	-	-	-
D	97,9	75,3	-	-	28,0	6,33
L	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-
Ep	-	51,2	4,7	69,1	-	-
H	97,9	69,3	-	-	-	-
D	> 99,5	81,2	-	-	17,7	1,6

TABELA 22- Efeito de Xilanases e Ligninases na Deslignificação de Polpa Kraft

Sequências	Rendimento (%)	Número Kappa	Eficiência de deslignificação (%)
Controle ¹	97,4	14,1	-
E	90,5	11,0	22,0
L	97,1	13,8	2,1
LE	91,1	10,9	22,7
X	92,4	12,6	10,6
XE	86,5	10,0	29,1
XL	89,9	11,9	15,6
XLE	84,3	9,4	33,3

1- A polpa foi lavada com água destilada antes da determinação do peso seco e número Kappa.

Xilanases de *Aspergillus niger* (Asperzyme 131) e de *P. janthinellum* (Penjanzyme) foram utilizadas em sequências curtas de branqueamento usando enzima e oxigênio (Tabela 23). Os resultados mostram que o tratamento de polpas com Asperzyme 131 é mais específico para remoção de hemiceluloses que com Penjanzyme, pois houve um aumento da viscosidade das polpas tratadas. Em geral, as polpas quando pré-tratadas com oxigênio facilitam a remoção de lignina nos tratamentos subsequentes. No caso das xilanases pode-se atribuir a maior

eficiência de deslignificação ao fato de que a hemicelulose das polpas fica mais disponível ao ataque enzimático. Resultados semelhantes foram obtidos por YANG & ERICKSSON (1992), que observaram uma redução de 22% no número Kappa em polpas obtidas de madeira dura pré-branqueadas com oxigênio e xilanase e uma redução de apenas 9,5% quando não se usou oxigênio. Os mesmos autores mostraram que para madeira mole a redução no número Kappa não chega a 10%.

TABELA 23- Características das Polpas Kraft Convencional e Pré-Branqueadas com Oxigênio Tratadas com Penjanzyme e Asperzyme.

Sequência	Número Kappa	Viscosidade (cp)	Eficiência de deslignificação	Seletividade	Glicose (%)	Xilose (%)	Lignina (%)
E	13,89	33,91	10,96	-	71,6	11,1	0,78
AE	11,29	19,15	27,62	0,63	71,3	11,35	0,81
XPenjE	10,73	14,64	31,20	0,55	66,25	10,44	0,89
OE	12,08	28,86	22,50	1,51	62,12	9,30	1,29
OXAspE	9,1	16,89	41,70	0,83	70,27	10,64	0,77
OXPenjE	8,9	14,17	42,95	0,74	68,53	10,60	0,67

E-Extração alcalina, XAsp- Asperzyme, XPen- Penjanzyme, O-Oxigênio.

O próximo passo do trabalho foi o branqueamento final com uma seqüência livre de cloro molecular usando xilanase (X). A grande vantagem das seqüências livres de cloro é o fato delas não levarem a formação de AOX nos efluentes, no entanto mesmo nas seqüências que contém dióxido de cloro, o teor estimado de AOX é cerca de 80% menor. Esse fato foi o que nos levou a avaliar uma seqüência a base de oxigênio, peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro e xilanases a fim de melhorar as características da polpa e manter os mesmos níveis de AOX. Para servir de comparação foi feito o branqueamento da polpa kraft na ausência de xilanase.

Os resultados médios dos ensaios de XOP(EOP)DP, OXP(EOP)DP, XP(EOP)DP e OP(EOP)DP estão apresentados na Tabela 24. Os dados demonstram diferenças na eficiência de deslignificação e seletividade entre as seqüências, as quais podem ser atribuídas à utilização das xilanases. Nos ensaios em que se empregaram xilanases e oxigênio obteve-se polpas com maiores valores de eficiência de deslignificação e de viscosidade que na seqüência de referência, OP(EOP)DP.

Considerando apenas as seqüências curtas O, OX ou XO pode-se dizer que a XO resultou em maior deslignificação. Isto foi surpreendente, pois esperava-se uma maior acessibilidade das enzimas após a remoção da lignina pelo oxigênio, conforme descrito por MACLEOD (1991). Diante desse fato, pode-se sugerir que a remoção de hemiceluloses de polpas é mais eficiente se o conteúdo de hemicelulose é alto.

O tratamento com oxigênio (O) removeu 25% da lignina residual da polpa e mesmo sendo de usada de forma limitada ainda causou uma redução de 20% na viscosidade da polpa. Após esta etapa a polpa ainda continuou com a cor marrom.

O número Kappa da polpa tratada apenas com oxigênio foi de 11,7 e quando o tratamento foi substituído por xilanases obteve-se um número kappa de 14,8. Comparando esses valores com os obtidos combinando xilanase e oxigênio o número kappa foi de 10,0.

TABELA 24 - Efeito do Pré-Branqueamento de Polpas Kraft com Xilanases em Sequências com Oxigênio e Ausentes de Cloro Gasoso

Sequências	Número Kappa	Viscosidade (cP)	Eficiência de Deslignificação (%)	Seletividade
O	11,7	25,0	25,0	1,27
OP	11,7	19,2	25,0	0,65
OP(EOP)	10,5	17,5	32,6	0,74
OP(EOP)DP	-	11,9	-	-
XO	10,0	22,7	35,9	1,33
XOP	9,9	17,8	36,5	0,85
XOP(EOP)DP	10,2	18,3	34,6	0,91
	-	12,6	-	-
OX	10,9	25,5	30,1	1,67
OXP	10,9	21,8	30,1	1,00
OXP(EOP)	9,6	19,6	38,5	1,04
XP(EOP)DP	-	10,8	-	-

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho levaram às seguintes conclusões:

1) Produção de xilanases

- As fontes de carbono xilana, bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado hemicelulósico são fontes de carbono adequadas para o cultivo de *P. janthinellum*, já que permite o crescimento micelial e o desenvolvimento da atividade xilanásica.

- O fungo *P. janthinellum* quando cultivado em meio à base de hidrolisado hemicelulósico produz uma mistura de enzimas (endo-xilanases, β -xilosidases, acetil-esterases) com capacidade de hidrolisar a xilana.

- O hidrolisado hemicelulósico, quando enriquecido com nutrientes, constitui-se um meio de baixo custo e portanto apropriado para a produção de xilanases em larga escala.

- Os componentes do hidrolisado hemicelulósico aparentemente exercem um efeito benéfico na produção de xilanase. Este efeito pode estar relacionado à presença de oligômeros de xilose no hidrolisado.

- O crescimento de *P. janthinellum* foi proporcional ao aumento da agitação, entretanto o valor máximo de atividade de xilanase (98 U/mL) foi encontrado na agitação de 60 rpm.

- O cultivo de *P. janthinellum* em incubadora de movimento rotatório apresenta resultados de atividade de xilanase superiores aos encontrados em fermentador

2) Branqueamento de polpa kraft de eucalipto, com estágios enzimáticos

- As condições ótimas do estágio X para deslignificação são 1 U de xilanase/g de polpa de celulose seca, 40 °C e 180 minutos de reação

- A substituição total de cloro por enzima reduz a eficiência de deslignificação

- O tratamento com xilanase e extração alcalina permitem uma redução de 25% do uso de reagentes clorados no branqueamento

- Uma polpa branqueada de elevada alvura (87,8 %), e boa viscosidade, pode ser obtida pela sequência XC(EO)HD, reduzindo-se o teor de cloro em 25%

- A substituição de xilanasas por ligninasas no primeiro estágio da sequência XCEHD do branqueamento, reduz a eficiência de deslignificação e torna a polpa mais escura que o controle sem enzima.

- As combinações ligninase + xilanase tornam mais fácil o branqueamento da polpa e são eficientes protetores de viscosidade

- Enzimas de fontes microbianas diferentes deslignificam as polpas de celulose de maneira diferente. O tipo de processo, as propriedades das enzimas e o objetivo da aplicação é que vão determinar a escolha final das enzimas a serem usadas no branqueamento.

7.PERSPECTIVAS

Ficam como sugestões para dar continuidade e complementar este trabalho, a realização de estudos visando:

-Verificar o efeito real do pH, do nível de aeração e da velocidade de agitação na produção de xilanase, consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular. Os resultados poderiam ser utilizados para aumentar o rendimento e na ampliação de escala do processo.

-Purificar e caracterizar todas as endo-xilanases e exo-xilanases produzidas por *P. janthinellum* a fim de estudar o mecanismo de degradação de xilanas.

-Determinar os tipos de xilanases e as combinações com outras enzimas, por exemplo lignina peroxidases e lacases, para serem utilizadas em biopolpação.

-Fazer uma análise do custo de produção da xilanase

8.PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE

- 1)MILAGRES, A.M.F.; DURAN, N. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp Progress Biotechnology **7**: 539-545 (1992)
- 2)E. CUROTTO; C. AGUIRRE; M. CONCHA; A. NAZAL; V. CAMPOS; E. ESPOSITO; R. ANGELO, A.M.F. MILAGRES; N. DURAN New methodology for fungal screening: xylanolytic enzymes Biotechnology Techniques **7**, 11:821-822 (1993)
- 3)CUROTTO, E; CONCHA, M; CAMPOS, V; MILAGRES, A.M.F.; DURAN, N Production of extracellular xylanases by *Penicillium janthinellum*: effect of selected growth conditions Applied Biochemistry and Biotechnology (in press)
- 4)DURAN, N.; ESPOSITO,E.; MILAGRES, A.M.F., ATTILI,D.;CUROTTO,E. Xilanases para a indústria de polpa e papel 3º Congresso Latino Americano y Nacional de Biotecnologia Santiago, Chile-16 a 19 de Novembro de 1993
- 5)N. DURAN; A.M.F. MILAGRES; E. ESPOSITO; HAUN, M. Xylanases delignification and chlorine free bleaching sequences in hardwood kraft pulps Proc. Int. Symp. on Bioconversion of Lignocellulosics ACS meeting- San Diego - March, 1994(in press)

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, J.; MIMS, C.W. Introductory mycology (3^a ed.) USA, John Wiley & Sons, 1979, 611 p.
- ANDREWARTHA, K.A.; PHILIPS, D.R.; STONE, B.A. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans, Carbohydrate Research, **77** :191-204, 1979.
- ANÔNIMO - No matter what you call it, chlorine-free bleaching is here to stay , Pulp and Paper Canada , **93** (5): 22-26, 1992.
- ARCHIBALD, F.S. Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*, Applied and Environmental Microbiology , **58** (9): 3101-3109, 1992.
- ASTM Methods Standard Method of test for lignin in wood p. 396-398, 1966
- AXEGARD, P. Improvement of bleach plant effluent by cutting back on Cl₂. Pulp and Paper Canada, **90** (5): 78-82, 1989.
- BAILEY, M.J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus* Applied Microbiology and Biotechnology, **30** : 5-10, 1989.
- BAILEY, M. J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. Biotechnology and Applied Biochemistry, **13**: 380-389, 1991.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology, **23** (3): 257-270, 1992.
- BAILEY , M.J.; VIIKARI, L. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media, World Journal of Microbiology and Biotechnology, **9**: 80-84, 1993.

- BAJPAI, P.; BAJPAI, P. Biobleaching of kraft pulp. Process Biochemistry, 27: 319-325, 1992
- BALL, A.S.; McCATHY, A.J. Saccharification of straw by actinomycete enzymes Journal of General Microbiology, 134 :2139-2147, 1988.
- BASTAWDE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8: 353-368, 1992
- BERENGER, J.-F.; FRIXON,C.; BIGLIARDI, J.; CREUZET, N. Production , purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*, Canadian Journal of Microbiology, 31: 635-643,1985.
- BIELY, P.; VRSANKA, M.; KRATKY, Z. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization, European Journal of Biochemistry, 108: 313-321, 1980.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnology, 3: 286-290, 1985.
- BIELY, P.; PULS,J.; SCHNEIDER, H. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems, FEBS Letters, 186: 80-4, 1985.
- BIELY, P., MACKENZIE, C.R., PULS, J., SCHNEIDER, H. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan, Bio/Technology, 4: 731-733, 1986.
- BIELY, P., MACKENZIE, C.R., SCHNEIDER, H. Production of acetyl esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophillum commune*, Canadian Journal Microbiology, 34 : 767-772 , 1988.
- BISWAS, S.R., JANA, S.C., MISHA, A.K., NANDA, G. Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*, Biotechnology and Bioengineering, 35 : 244-251, 1990.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding , Analytical Biochemistry, **72** : 248-54, 1976.
- BRAY, M.R., CLARKE, A.J., Essencial acboxi groups in xylanase A, Biochemical Journal, **270** : 91-96, 1990.
- BRICE, R.E.; MORRISON, I.M. Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fiber in an artificial rumen, Applied Biochemistry and Biotechnology, **30**: 9-15, 1991.
- BRILLOUET, J. -M., MOULIN, J. -C., AGOSIN, E., Production, purification and properties of an α -L- arabinofuranosidase from *Dichomitus squalens*, Carbohydrate Research, **144** : 113-126, 1985.
- BRILLOUET, J.-M. Mode of action of xylanases II from *Polyporus tulipiferae* on oat spelt arabinoglucuronoxylan and larchwood 4-O-methylglucuronoxylan, Carboydrate Research, **159**, 165-170, 1987.
- BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pini kraft pulp , Applied Microbiology and Biotechnology **37** : 825-829, 1992.
- CARLBERG, G.E.; KRINGSTAD, A.; MATINSEN, K.; NASHAUG, O. Environmental impact of organochlorine compounds discharged from the pulp and paper industry, Paper ja Puumapper och Tra, **4**: 336-41, 1987.
- CHAUDHARY, K.; TAURO, P. Selective induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei* by xylan, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, **15**: 185-187, 1982.
- CHAUDRI, S., THAKUR, I.S., GOEL, R., JOHRI, B.N. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Melanocarpus albomyces*, Biochemistry. International., **17** : 563-575, 1988.

- CHAUVET, J.-M.; COMTAT, J. NOE, P. Assistance in bleaching of never-dried pulps by use of xylanases, consequences on pulp properties. In: International Symposium Wood and Pulping Chemistry 2 : 325-327, Paris, 1987.
- CLAEYSSSENS, M., LOONTIENS, F.G., KESTERS-HILDERSON, H., DE BRUYNE, C.K. Partial purification and properties of an *Aspergillus niger* β -D-xylosidase, Enzymology, 40:177-198, 1970a.
- CLAEYSSSENS, M. KERSTERS-HILDERSON, H., VAN WAUWE, J.-P., DE BRUYNE, C.K. Purification of *Bacillus pumilus* β -D-xylosidase by affinity chromatography, FEBS letters., 11 : 336-338, 1970b.
- CLARCK, T.A.; STEWARD, D.; BRUCE, M.E.M.; McDONALD, A.G.; SINGH, A.P.; SENIOR, D.J. Improved bleachability of radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes, Appita, 44 (6): 389-404, 1991.
- COMTAT, J., Isolation, properties and postulated role of some of the xylanases from the basidiomycete *Sporotrichum dimorphosporum*, Carbohydrate Research, 118 : 215-231, 1983.
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4 - D Xylan - degrading enzyme systems: biochemistry molecular biology and applications, Biotechnology Applied Biochemistry, 17: 259-289, 1993.
- D'ALMEIDA, M.L.O. Branqueamento de pastas celulósicas, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 1978, 66p
- DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G.N. Purification, properties, and mode of action of hemicellulase I produced by *Ceratocystis paradoxa*, Carbohydrate Research, 39: 97-114, 1975a.

- DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G.N. Purification, properties, and mode of action of hemicellulase II produced by *Ceratocystis paradoxa*, Carbohydrate Research, **42**: 107-123, 1975b.
- DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G.N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action , Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry **32**: 277-352, 1976.
- DEKKER, R.F.H. Bioconversion of hemicellulose: Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose, Biotechnology and Bioengineering, **25**: 1127-1146, 1983.
- DEKKER, R.F.H. The enzymatic hydrolysis of biomass. IN: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA de BIOMASSA, 2. Maringá, 1985.
- DESHPANDE, V., LACHKE, A., MISHA, C., KESKAR, S. RAO, M. Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa*, Biotechnology and Bioengineering, **28**: 1832-1837, 1986.
- DESHPANDE, V., HINGE, J., RAO, M. Chemical modification of xylanases: evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site, Biochimica et Biophysica Acta, **1041**: 172-177, 1990.
- DUBEAU, H.; CHARAL, D.S.; ISHAQUE, M. Xylanase of *Chaetomium cellulolyticum*: its nature of production and hydrolytic potential. Biotechnology Letters, **9**(4): 275-280, 1987.
- ERICKSSON, K.-E.L. Biotechnology in the pulp and paper industry, Wood Science and Technology, **24** : 79-101, 1990.
- ESPOSITO, E. Seleção de fungos produtores de xilanases: aplicação na indústria papeleira - Anais do 1º Seminário Nacional de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro, 21-22 Out, 1993

- ESTEBAN, R., VILLANUEVA, J.R., VILLA, T.G. β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12, Canadian Journal of Microbiology, **28**: 733-739, 1982.
- ESTEBAN, R., CHORDI, A., VILLA, T.G. Some aspects of a 1,4- β -D-xylanase and a β -D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26, FEMS Microbiologic Letters **17**: 163-166, 1983.
- EYZAGUIRRE, J.; SCARPA, J., BELANCIC, A.; STEINER, J. The xylanase system of *Penicillium purpurogenum* In: International Symposium on Xylans and Xylanases p.505, 1992.
- FARREL, R. Biocatalysts hold promises of better pulp quality Tappi Journal, **67** (10): 31-33, 1984.
- FARREL, R.L. Use of RLDTM 1-6 and other lignolytic enzymes in the bleaching of kraft pulp. 1987 Application: United States 4690895.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, NY, USA, 1989, 613p.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; RAMON, D.; PINAGA, F.; VALLES, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiology Letters, **91**: 91-96, 1992.
- FREDERICK, M.M., FREDERICK, J.R., FRATZKE, A.R., REILLY, P.J. Purification and characterization of a xylobiose- and xylose-producing endo-xylanase from *Aspergillus niger* Carbohydrate Research, **97**: 87-103, 1981.
- FREDERICK, M.M., KIANG, C. -H., FREDERICK, J.R., REILLY, P.J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points, Biotechnology and Bioengineering, **27**: 525-532, 1985.

- FOURNIER, A. R.; FREDERICK, M.M.; FREDERICK, J.R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger* III. An enzyme of PI 3.65. Biotechnology and Bioengineering, 27: 539-46, 1985.
- FUNAGUMA, T.; NAITO, S.; MORITA, M.; OKUMURA, M.; SUGIURA, M.; HARA, A., Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Barnier and Sartory, Agriculture Biological Chemistry , 55, 1163-5, 1991.
- FUJITA, K.; KONDO, R.; SAKAI, K.; KASHINO, Y.; TAKAHARA, Y. Biobleaching of kraft pulp using white-rot fungus IZU-154, Tappi Journal, 74: 123-127, 1991.
- GATTINGER, L.D., DUVNJAK, Z., KHAN, A.W. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*, Applied Microbiological and Biotechnology, 33, 21-5 , 1990.
- GHOSH, V.K.; DEB, J.K. production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. Applied Microbiology and Biotechnology, 29: 44-7, 1988.
- GILBERT, M.; BREU, C.; YAGUCHI, M.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a xylanase from the Biochemistry and Biotechnology, 34/35: 247-259, 1992.
- GOMES, J.; GOMES, I.; KREINER, W.; ESTERBAUER, H.; SINNER, M.; STEINER, W. Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan Journal of Biotechnology, 30:283-97, 1993.
- GRATZER, W.S. Spectrophotometric determination of protein concentration in the short-wavelength ultraviolet , Handbook of Biochemistry and Molecular-Physical and Chemical Data, vol 2. , 1976, p.197.
- GUSEK, T.W.; JOHSON, R.D.; TYN, M. T.; KINSELLA, J. E. Effect of Agitational Shear on Growth and Protease Production by *Trermomonospora fusca*. Biotechnology and Bioengineering , 37: 371-374, 1991.

- HARADA, H.; CÔTÉ, JR., W.A. Structure of wood. In: TAKAYOSHI H. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, 1985, p.679.
- HARGER, C. C. Atividade de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosidasas de Humicola sp. Atcc 60849. Viçosa, UFV, 1987, 50p. (Tese de Mestrado).
- HASHIMOTO, S., MURAMATSU, T., FUNATSU, M. Studies on xylanase from *Trichoderma viride* Part I. Isolation and some properties of crystalline xylanase, Agriculture and Biological Chemistry, **35** : 501-8, 1971
- HESPELL, R.B., O'BRYAN-SHAH, P.J. Esterase activities in *Butivibrio fibrisolvens* strains, Applied and Environmental Microbiological **54**: 1917-1922 (1988).
- HEMLING, O. SUESS, H.U. MEIER, J. BERGER, M. Mill experience with oxygen and hydrogen peroxide bleaching stages, Tappi Journal **71**: 55-61, 1989.
- HONDA, H., KUDO, T., IKURA, Y., HORIKOSHI, K. Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* n°. C-59-2, Agriculture and Biological Chemistry, **29**: 520-4, 1985.
- HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANSKA, M. Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. Archives of Microbiology, **144**: 307-11, 1986.
- HRMOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, E.; BIELY, P. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme system in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose, Journal of General Microbiology, **137**, 541-547, 1991.
- JANES, R.L. The chemistry of wood and fibers. In: MacDonald, R.G.; Franklin, J.N. The Pulping of Wood. New York, Mc Graw-Hill, 1969, p33.
- JOHN, M. SCHMIDT, B., SCHMIDT, J. Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylanases and a β -xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger* Canadian Journal of Biochemistry, **57**: 125-134, 1979.
- JOHN, M., SCHMIDT, J. Xylanase and β -xylosidase of *Trichoderma* Methods in Enzymology, **160**: 662-671, 1988.

- JOHNSON, K.G., HARRISON, B.A., SCHNEIDER, H., MACKENZIE, C.R., FONTANA, J.D. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp., Enzyme and Microbial Technology, **10**: 403-409, 1988.
- KANTELINEN, A. Enzymes in bleaching of kraft pulp. Espoo, Finland, Helsinki University of Technology, 1992. 86p (Dissertation for the degree of Doctor of Technology).
- KARNI, M.; DEOPURKAR, R.L.; RALE, V.B. β -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues World Journal of Microbiology and Biotechnology **9**: 475-478, 1993.
- KATO, Y., NEVINS, D.J. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-(1,3),O- β -D-xylopyranosyl-(1,4)-D-xylopyranose as a component of *Zea* shoot cell-walls, Carbohydrate Research, **137**: 139-150, 1985.
- KESKAR, S.S., SRINIVASAN, M.C., DESHPANDE, V.V., Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and Cysteine residues at the active site, Biochemical Journal, **261**: 49-55, 1989.
- KESKAR, S.S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7: cultural conditions and enzyme properties. Biotechnology Letters, **14**(6): 481-486, 1992.
- KHANDKE, K.M., VITHAYATHIL, P.J., MURTHY, S.K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **274** (2): 491-500, 1989.
- KHASIN, A., ALCHANATI, I., SHOHAM, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. Applied and Environmental Microbiology, **59** (6): 1725-1730, 1993.
- KIRK, T.K.; YANG, H.H. Partial delignification of unbleached kraft pulp with lignolytic fungi, Biotechnology Letters, **1**(9): 347-352, 1979.

- KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M.; MURTAGH, K.E.; FARREL, R.L. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enzyme and Microbial Technology **8**: 27-32, 1986.
- KIRKPATRICK, N.; REID, I.D.; ZIOMEK, E.; PAICE, M.G. Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam, Applied Microbiology and Biotechnology, **33**: 105-108, 1990.
- KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and properties of endo-1,4- β -xylanase from *Humicola lanuginosa*. Journal of Fermentation Technology, **62**: 415-420, 1984.
- KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and characterization of extracellular β -xilosidase e β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. Agricultural and Biological Chemistry, **50(7)**: 1703-1711, 1986.
- KLUEPFEL, D. ; DAIGNEAULT, N.; MOROSOLI, R.; SHARECK, F. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. Applied Microbiology and Biotechnology, **36**: 626-631, 1992.
- KOPONEN, R. Enzyme systems prove their potential Pulp and paper International (nov): 20-25, 1990.
- KORMELINK, F.J.M.; SEARLE-VAN LEEUWEN; WOOD, T.M.; VORAGEN, A.G.J. Purification and Characterization of three endo-(1,4) β -xylosidase from *Aspergillus awamori* Journal of Biotechnology, **27**: 249-265, 1993.
- LACHKE, A.H.; DESHPANDE, M.V. *Sclerotium rolfsii*: status in cellulase research. FEMS Microbiology Reviews, **54** : 177-194, 1988.
- LAPPALAINEN, A. Purification and characterization of xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei* Biotechnology and Applied Biochemistry, **8** : 437-448, 1986.

- LEATHERS, T.D. Purification and properties of xylanase from *Aureobasidium* Journal Industrial Microbiology, 4: 341-348, 1989.
- LEE, S.F.; FORSBERG, C.W. Isolation and some properties of a β -xylosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Applied and Environmental Microbiology, 53: 651-654, 1987.
- LEE, S.F.; FORSBERG, C.W.; RATTRAY, J.B. Purification and characterization of two endoxylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, Applied and Environmental Microbiology, 53: 644-650, 1987a.
- LEE, H.; TO, R.J.B.; LATTA, R.K.; BIELY, P.; SCHNEIDER, H. Some properties of extracellular acetylxylan esterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, Applied and Environmental Microbiology, 53: 2831-2834, 1987b.
- MACKENZIE, C.R.; BILOUS, D.; SCHNEIDER, H.; JOHNSON, K.G. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2835-2839, 1987.
- MAC LEOD, M. Chlorine-free bleaching; ozone and enzymes to the rescue? Tappi Journal (nov): 204-208, 1991.
- MAGEE, R. J. & KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 32: 61-93, 1985.
- MANOIR, J.R.; HAMILTON, J. SENIOR, D.J.; BERNIER, R.; GRANT, J.E.; MOSER, L.E.; DUBELSTEN, P. Biobleaching of kraft pulps with cellulase-free xylanase. In: International Pulp Bleaching Conference: 123-138, Stockholm, 1991.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* Journal of Bacteriology, 73: 269-278, 1957.
- MARUI, M.; NAKANISHI, K.; YASUI, T. Chemical modification of xylanases from *Streptomyces* sp Bioscience Biotechnology Biochemical, 57 (4): 662-663, 1993.

- MATSUO, M.; FUJIE, A.; WIN, M.; YASUI, T. Four types of β -xylosidases from *Penicillium wotmanni* IFO 7237 Agricultural and Biological Chemistry, **51**: 2367-2379, 1987.
- MILAGRES, A.M.F. Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum* Viçosa, UFV, 1988 (Tese de Mestrado).
- MILAGRES, A.M.F.; LACIS, L.S. Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentation, Biotechnology Letters, **13** (2): 113-118, 1991.
- MILAGRES, A.M.F.; LACIS, L.S.; PRADE, R.A. Characterization of xylanase production by a local isolated of *Penicillium janthinellum*, Enzyme and Microbial Technology, **15**: 248-253, 1993.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry, **31**: 426-428, 1959.
- MISHRA, C.; SEETA, R.; RAO, M.; Production of xylanolytic in association with cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*, Enzyme and Microbial Technology, **7**: 295-299, 1985.
- MISHRA, C.; FORRESTER, I.T., KELLEY, B.D.; BURGESS, R.R.; LEATHAM, G.F. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinus edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate Applied Microbiology and Biotechnology **33**: 226-232, 1990.
- MITARD, A.; RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates, Biotechnology and Bioengineering, **32**: 835-840, 1988.
- MORALES, P.; MADARRO, A.; PEREZ-GONZALEZ, J.A.; SENDRA, J.M.; PINAGA, F.; FLORS, A. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa* Applied and Environmental Microbiology, **59** (5): 1376-1382, 1993.
- MOUNTEER, A.H.; COLODETTE, J.L.; GOMIDE, J.L.; CAMPOS, A.S. Alternativas para o branqueamento sem cloro molecular, O Papel p. 25-35, 1992.

- MURTY, M.V.S.; CHANDRA, T.S. Expression of xylanase and cellulase enzymes in a newly isolated *Clostridium* sp. SAIV Enzyme and Microbial Technology, 13 : 430-435, 1991.
- MUTSAERS, J.H.G.M. Xylanase in breadmaking. In: XYLANS AND XYLANASES INTERNATIONAL SYMPOSIUM. Wageningen, The Netherlands, Novo Nordisk, December 8-11, 1991. p48.
- MYBURGH, J.; PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G. Production of xylan-hydrolyzing enzymes by *Aureobasidium pullulans*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 72 (2): 135-137, 1991.
- NANMORI, T; WATANABE, T.; SHINKE, R.; KOHNO, A.; KAWAMURA, Y. Purification and properties by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain Journal of Bacteriology, 172:6669-6672, 1990
- NISSEN, A.M.; ANKER, L.; MUNK, N.; LANGE, N.K. Xylanases in the pulp and paper industry In: VISSER, J. & BELDMAN, G. (eds) Xylans and Xylanases Proceedings of an International Symposium. Wageningen, The Netherlands, Elsevier 1992. p.325
- NISHITANI, K.; NEVINS, D.J. Enzymic analysis of feruloylated arabinoxylans (Feraxan) derived from *Zea mays* cellwalls I. Purification of novel enzymes capable of dissociating feraxan fragments from *Zea mays* coleoptile cell wall Plant Physiology, 87 : 883-890, 1988
- NISHITANI, K.; NEVINS, D.J. Glucuronoxylan xylanohydrolase. A unique xylanase with the requirements for appendant glucuronosyl units Journal of Biological Chemistry, 266, 6539-6543, 1991.
- NOE, P.; CHEVALIER, J. MORA, F. COMTAT, J. Action of xylanases on chemical pulp fibers . Part II: Enzymatic beating. Journal of Wood Chemistry and Technology, 6 (2): 167-184, 1986.

- OKEKE, B.C.; PATERSON, A. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in *Streptomyces* sp. World Journal Microbiology and Biotechnology, 8: 483-487, 1992.
- OKEKE, B.C.; OBI, S.K.C. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 345- 349, 1993.
- OLSEN, W.L.; GALLAGHER, H.P.; BURRIS, K.A.; BHATTACHARJEE, S.S.; SLOCOMB, J.P.; DeWITT, D.M. Enzymatic delignification of lignocellulosic material. 1991 International Paper Company (USA) 0406 617 A2.
- ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: A review, Biotechnology Advances, 11: 179-198, 1993.
- OSHIMA, M. Wood Chemistry Process Engineering Aspects USA - Noyes Development Corporation, 1965, 157p.
- OZCAN, S.; KOTTER,P.; CIRIACY, M. Xylan-hydrolyzing enzymes of the yeast *Pichia stipitis* Applied Microbiology and Biotechnology 36: 190-195, 1991.
- PAICE, M.G.; JURASEK, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis, Journal of Wood Chemistry and Technology, 4 (2): 187-198 ,1984.
- PAICE, M.G.; BERNIER, Jr. R.; JURASEK,L. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene, Biotechnology and Bioengineering, 32 : 235-239, 1988.
- PAICE, M.G.; JURASEK. L.H.C; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD,F. Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor* Tappi Journal 72 (5): 217-221, 1989.

- PAICE, M.G.; GURNAGUL, N.; PAGE, D.H. JURASEK, L., Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology, 14 (4) : 272-276, 1992.
- PALMA, M.B. Influência da Agitação e da Aeração na Atividade de Xilanase de *Penicillium janthinellum* Viçosa, MG, UFV, 1993. 79p (Tese de Mestrado).
- PANDA, T Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. Process Biochemistry, 24 (3): 104-108, 1989.
- PATEL, N.; GRABSKI, A.C.; JEFFRIES, T.W. Chromophore release from kraft pulp purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases Applied Microbiology and Biotechnology, 39: 405-412, 1993
- POMMIER, J.-C.; FUENTES, J. L-. GOMA, G. Using enzymes to improve the process and the product quality in recycled paper industry. part 1: the basic laboratory work. Tappi Journal (June) 72: 187-191, 1989.
- POUTANEN, K.; RATTO, M.; PULS, J.; VIIKARI, L. Evaluation of different microbial xylanolytic systems Journal of Biotechnology, 6: 49-60, 1987.
- POUTANEN, K. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*, Journal of Biotechnology, 7, 271-282, 1988.
- POUTANEN, K.; PULS, J. Characterization of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 425-432, 1988.
- POUTANEN, K.; SUNDBERG, M. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 419-424, 1988.

- POUTANEN , K., BAILEY, M., SUNDBERG, M., RATTO, M. PULS, J. Enzymatic solubilization of xylans. In: RALEIGH (ed). Biotechnology in pulp and paper industry 1989. p-559-565.
- POUTANEN, K.; SUNDBERG,M.; KORTE, H. PULS, J. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei* Applied Microbiology and Biotechnology, **33**, 506-510, 1990.
- PRIEM, B.; DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. -C. Production of β -1,4- xylanase in continuous culture by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. Biotechnology Letters, **13** (3): 149-154, 1991.
- PULS, J.; SCHMIDT, O.; GRANZOW, C. α -glucuronidase in two microbial xylanolytic systems, Enzyme and Microbial Technology, **9**: 83-88, 1987.
- RAJARAM,S.; VARMA, A. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on wastes. Applied Microbiology and Biotechnology, **34**: 141-144, 1990.
- REID, I.D.; PAICE, M.G.; HO, C.; JURASEK, L. Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*, Tappi Journal, (Aug) **73**: 149-153, 1990.
- REILLY, P.J. Xylanases: Structure and Function. In: Alexander Hollaender. Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals 1981 p.111-129.
- RICHARDS, G.; SHAMBE, T. production and purification of two hemicellulases from *Cephalosporium sacchari*. Carbohydrate Research, **49**: 371-381, 1976.
- ROBISON, P.D. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30, Biotechnology Letters, **6** (2): 119-122, 1984.
- RODIONOVA, N.A.; TAVOBILOV, I.M.; BEZBORODOV, A.M. β -xylosidase from *Aspergillus niger* 15:Purification and properties, Journal of Applied Biochemistry, **5**: 300-312, 1983.

- RODRIGUEZ, H.; PONCE, T.; DE LA TORRE, M.; ENRIQUEZ, A. Effect of oxygen and air flow on xylanolytic and cellulolytic activity from bacterial cultures grown on bagasse pith, Biotechnology Letters, 13 (3): 563-566, 1991.
- ROSS, N.W.; JOHNSONS, K.G.; BRAUN, C.; MACKENZIE, C.R. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltoides*: Effects of combinations of β -mannanases, xylanase, and acetyl xylan esterase, Enzyme and Microbial Technology, 14 : 90-95, 1992.
- SAKKA, K.; MAEDA, Y.; HAKAMADA, Y.; TAKAHASHI, N.; SHIMADA, K. Purification and some properties of xylanase from *Clostridium stercorarium* strain HX-1. Agricultural and Biological Chemistry, 55 (1): 247-248, 1991.
- SAXENA, S.; BAHADUR, J.; VARMA, A. Production and localization of carboxymethylcellulase, xylanase and β -glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 34 ; 668-670, 1991.
- SEGEL, 1975. Biochemical Calculations John Wiley & Sons, 1975, p.441
- SENIOR, D.J.; MAYERS, P.R.; SADDLER, J.N. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58. Applied Microbiology and Biotechnology, 32 : 137-142, 1989.
- SENIOR, D.J.; MAYERS, P.R.; SADDLER, J.N. The interaction of xylanases with commercial pulps Biotechnology and Bioengineering, 37 ; 274-279, 1991.
- SENIOR, D.J.; HAMILTON, J. Biobleaching with xylanases brings biotechnology to reality: economic and environmental advantages of using xylanases in bleach plants catapult from the lab to the mill, Pulp and Paper (Sept): 111-114, 1992.
- SHIELDS, R.; BURNETT, W. Determination of protein-bound carbohydrate in serum by a modified anthrone method Analytical Chemistry, 32 (7): 885-886, 1960
- SIKYTA, B. Methods in Industrial Microbiology Chichester, Ellis Horwood limited, 1983

- SMITH, D.C.; BHAT, K. M.; WOOD, T.M. Xylan-hydrolyzing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7: 475-484, 1991.
- SMITH , D.C.; WOOD, T.M. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production. Biotechnology and Bioengineering, 38, 883-890, 1991.
- SMITH , D.C.; FORSBERG, C.W. α -glucuronidase and other hemicellulase activities of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw, Applied and Environmental Microbiological, 57: 3552-3557, 1991.
- STEINER, W.; LAFFERTY, R.M.; GOMES, I.; ESTERBAUER, H. Studies on a wild strain of *Schizophyllum commune* : cellulase and xylanase production and formation of the extracellular polysaccharide schizophyllan. Biotechnology and Bioengineering, 30 : 169-178, 1987.
- SUNDBERG, M.; POUTANEN, K.; MARKKANEN, P.; LINKO, M. An extracellular esterase of *Aspergillus awamori* Biotechnology and Applied Biochemistry, 12 : 670-680, 1990.
- SUNDBERG, M.; POUTANEN, K. Purification and properties of two acetylxylan esterases of *Trichoderma reesei*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 13, 1-11, 1991.
- TAKENISHI, S. TSUJISAKA, Y. Purification and some properties of three xylanases from *Penicillium janthinellum* Biourge. Journal of Fermentation Technology, 51 (7): 458-468, 1973.
- TAKENISHI, S.; TSUJISAKA, Y.; FUKUMOTO, J. Studies on hemicellulases. IV. Purification and properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus niger* van Tieghem, Journal of Biochemistry, 73: 335-343, 1973.

- TAN, L.U.L.; WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of two-D-Xylanases from *Trichoderma harzianum* Enzyme and Microbial Technology, 7: 425-430, 1985.
- TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Canadian Journal of Microbiology, 33 (8): 689-692, 1987.
- TANAKA, T.; SHIMOMURA, Y. HIMEJIMA, M.; TANIGUCHI, M. OI S.; Characterization of xylan-utilizing anaerobes from mesophilic and thermophilic methane sludge and their xylan degrading enzymes, Agricultural and Biological Chemistry, 50 (9): 2185-2192, 1981.
- TAPPI. Test Methods, Atlanta, Tappi press, 1988. p. irreg.
- TENKANEN, M.; PULS, J; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microbial Technology, 14: 566-574, 1992.
- TIEN, M.; KIRK, , T.K., Lignin - degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science, 221(4611): 661-663, 1983.
- TIMELL, T.E. Wood hemicelluloses: Part II, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 19: 409-83, 1965.
- THOMPSON, N.S. Hemicellulose as a biomass resource. In: SOLTES, J. (ed) Journal Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals. New York, Academic Press, 1983. p. 101-119.
- TOLAN, J.S.; CANOVAS, R.V. The use of enzymes to decrease the Cl₂ requirements in pulp bleaching; Xylanase enzymes improve effectiveness of conventional chemical bleaching, Pulp and Paper Canada, 93 (5): 39-42, 1992.
- UCHINO, F., NAKANE, T. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. Agricultural and Biological Chemistry , 45 (5): 1121-1127, 1981.

- VAN DER BROECK, H.C.; DE GRAAFF, L.L.; HILLE, J.D.R.; VAN OUYEN, A.J.J.; VESSER, J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. 1990 European Patent Applied 90/202,020.
- VICUÑA, R. Bacterial degradation of lignin Enzyme and Microbial Technology **10**: 646-655, 1988.
- VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. In: International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry 67-69, Stockholm 16-19 June, 1986.
- VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; LINKO, M.; SUNDQUIST, J. Application of enzymes in bleaching. In: International Symposium of Wood and Pulp Chemistry, **1** : 151-154, Paris 27-30 April, 1987.
- VIKARI, L. Pulp and the environment , Paperi ja Puu- Paper and Timber, **73** (5): 384-389, 1991.
- VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; RATTO, M.; SUNDQUIST, J. Enzymes in pulp and paper processing In: LEATHAM, G.F.; HIMMEL, M.E. Enzymes in Biomass Conversion **2**: 12-21, 1991.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). Microbial Genetics Bulletin, **13**: 42-43, 1956.
- VYAS, P.; CHAUTHAIWALE, V.; PHADATARE, S.; DESHPANDE, V., SRINIVASAN, M.C. Studies on the alkalophilic *Streptomyces* with extracellular xylanolytic activity. Biotechnology Letters, **12** (3): 225-228, 1990.
- WEBER, K.; PRINGLE, J.R.; OSBORN, M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamid gel Methods in Enzymology **26**: 3-27, 1972.

- WILLIAMS, A.G.; WITHER, S.E. The regulation of xylanolytic enzyme formation by *Butyrivibrio fibrisolvens* NCFB 2249 Letters in Applied Microbiology, **14** (5): 194-198, 1992.
- WOOD, T.M.; McCRAE, S.I. Studies of two low-molecular-weight endo-(1,4)- β -xylanases constitutively synthesised by the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*, Carbohydrate Research, **148**: 321-330, 1986.
- WOODWARD, J. Xylanases: Functions, properties and applications. In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, 1984. p.9-30.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms; Functions, Properties and Applications. Microbiology Reviews, **52**(13): 305-317, 1988.
- WONG, K.K.Y.; SADDLER, J.N. *Trichoderma* xylanase, their properties and applications Critical Reviews in Biotechnology, **12** (5/6): 413-435, 1992.
- YANG, J.I.; ERICKSSON, K.-E.L. , Use of hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps, Holzforschung, **46** (6): 481-488, 1992.
- YASUI, T.; MARUI, M.; KUSAKABE, I.; NAKANISHI, K. Xylanases of *Streptomyces* Methods in Enzymology **160** : 648-654, 1988.
- YOSHIOKA, H; NAGATO, N.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N.; HAYASHIDA, S. Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Agricultural and Biological Chemistry, **45** (11): 2425-2432, 1981.
- YU, E.K.C.; TAN, L.U.L.; CHAN, M.K.-H.; DESCHATELETS, L.; SADDLER, J.N. Production of thermostable fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Enzyme and Microbial Technology , **9** : 16-24, 1987

10.APÊNDICES

APÊNDICE I

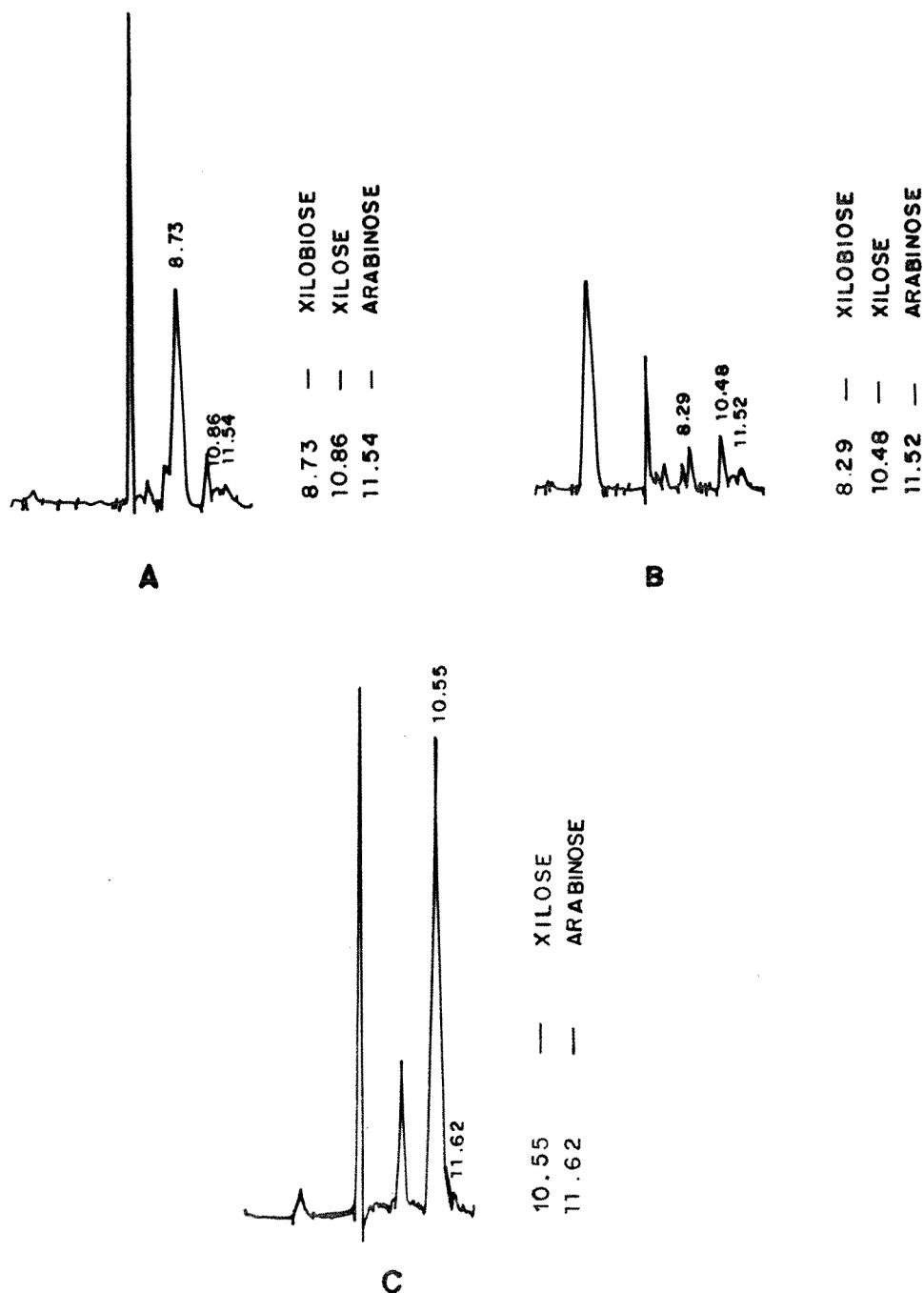
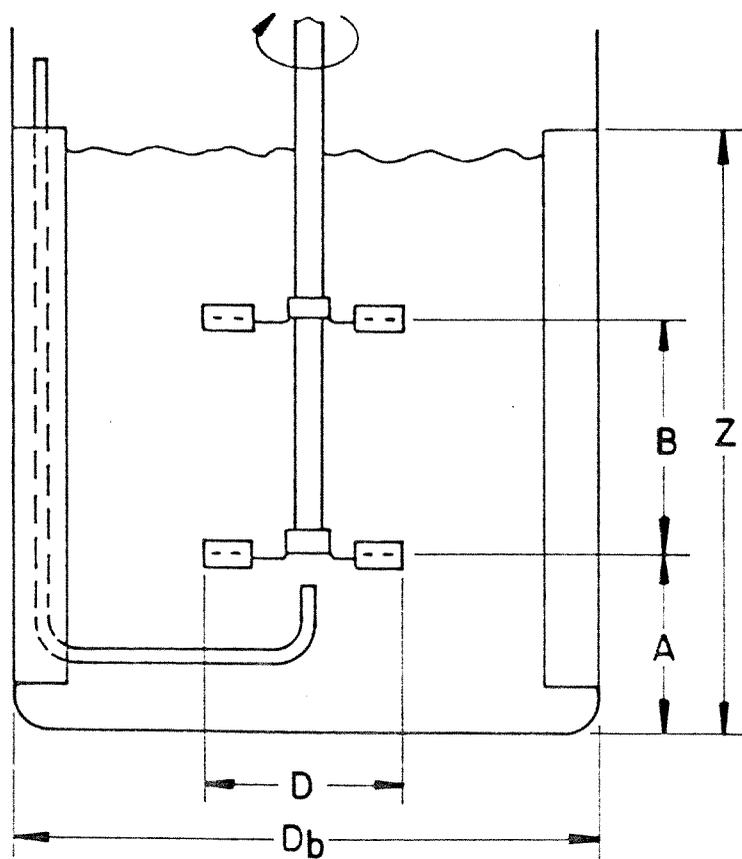


FIGURA 1A - Análise dos Açúcares Presentes nas Frações I (A), II (B), III (C) do Hidrolisado de Bagaço, Determinados por HPLC.

APÊNDICE II



$$Z / D_b = 1,0 \quad ; \quad D / D_b = 0,34$$

$$A / D = 0,8 \text{ a } 1,0 \quad ; \quad B / D = 1,0 \text{ a } 1,2$$

FIGURA 2A - Esquema da montagem do Fermentador para Síntese de Xilanase por *P. janthinellum* a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar

APÊNDICE III

TABELA 1A- Fator f para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato

P	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0,958	0,960	0,961	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
40	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
50	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
60	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
70	1,044									

TABELA 2A- Fator para Correção da Temperatura

T (°C)	f(T)	T (°C)	f(T)
18	1,0910	23	1,025
18,5	1,0845	23,5	1,0195
19	1,0720	24	1,0130
19,5	1,0715	24,5	1,0055
20	1,0650	25	1,0000
20,5	1,0585	25,5	0,9935
21	1,0520	26	0,9870
21,5	1,0455	26,5	0,9805
22	1,0390	27	0,9740
22,5	1,0325	27,5	0,9575