



1150025630



IQ

T/UNICAMP An43x

RAQUEL SIMÕES ANGELO

XILANASES DE *ASPERGILLUS SP* 2M1: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS KRAFT.

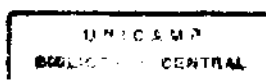
Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Mestrado defendida por Raquel Simões Angelo, aprovada pela comissão julgadora.

Raquel Simões Angelo



**Tese orientada pelo
Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero**

Campinas, 1995.



C. An. 00076150.4

UNIDADE	IQ
Nº ORÇ. MAQ.	
T. D. F. M. L.	
Nº	25630
S. D.	433/95
C. I.	☐ ☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	20/09/95
Nº CPD	

Angelo, Raquel Simões

Xilanases de aspergillus SP 2M
! produção, caracterização e a
plicação no branqueamento de p
T/UNICAMP/An43x

(25630/95)

Aos meus pais, Ivan e Regina

AGRADECIMENTOS

Ao professor Nelson Durán pela ótima orientação.

À Professora Emilia Curotto pelas cepas de *Aspergillus sp 2M1*.

À Adriane e a todos do CEBIQ-FAENQUIL pela valiosa ajuda no branqueamento.

À Riocell e seus funcionários por possibilitarem meu treinamento em branqueamento.

Aos funcionários e colegas de laboratório por toda colaboração e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Componentes Estruturais da Madeira	3
2.2 Degradação Enzimática de Xilanas	9
2.3 Fatores que Influenciam a Produção de Xilanases por Microrganismos	17
2.4 Aplicações Industriais de Xilanases	20
2.5 Branqueamento de Polpa de Celulose	21
2.5.1 Branqueamento com Microrganismos	22
2.5.2 Branqueamento com Enzimas Hemicelulolíticas	23
2.6 Tratamento de Efluentes	27

3. OBJETIVOS DA TESE	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Material	30
4.1.1 Microorganismo	30
4.1.2 Reagentes	30
4.1.3 Meio de Cultura e Manutenção do fungo	30
4.1.4 Enzimas Utilizadas nos Ensaios de Branqueamento	31
4.2 Métodos	31
4.2.1 Obtenção do Extrato Enzimático	31
4.2.2 Determinação das Atividades Enzimáticas	32
a) Xilanase	32
b) Xilosidase	33
c) Celulase	33
d) Protease	34
4.2.3 Determinação de Proteínas	34
4.2.4 Preparo do Inóculo	35
4.2.5 Preparação das Xilanas de Pinus e Eucalipto	35
4.2.6 Efeito da Temperatura de Incubação na Produção de Xilanase	36
4.2.7 Influência da Fonte de Carbono e Nitrogênio	37
4.2.8 Influência do Estado Físico do Meio de Cultura e da Agitação na Produção de Xilanase	37
4.3 Propriedades do Extrato Enzimático Bruto	37
4.3.1 Efeito do pH na Atividade de Xilanase	37
4.3.2 Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanase	38

4.3.3 Cinética Xilanase x Protease	38
4.3.4 Estabilidade Térmica da Xilanase	38
4.3.5 Modificação Química e Grau de Inativação de Xilanases de <i>Aspergillus sp</i> 2M1	39
4.4 Polpa	40
4.4.1 Experimentos de Branqueamento	41
4.4.2 Controle dos Processos de Branqueamento	44
a) Tratamento com Ozônio	44
b) Determinação do Número Kappa	44
c) Determinação da Viscosidade	46
d) Determinação da Alvura	46
e) Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade	47
4.5 Tratamento de Efluentes	47
4.5.1 Determinação da Cor Aparente	48
4.5.2 Determinação de Fenóis Totais	48
4.5.3 Determinação de Lignina Residual	49
4.5.4 Determinação de Açúcares Redutores	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Produção de Xilanases, β -Xilosidases e Celulases em Diferentes Fontes Polissacarídeas	50
5.2 Condições para Crescimento de <i>Aspergillus sp</i> 2M1 e Produção de Xilanases	53
5.2.1 Efeito da Temperatura de Incubação no Crescimento e Produção de Xilanases por <i>Aspergillus sp</i> 2M1	53
5.2.2 Influência do Estado Físico do Meio de Cultura e da Agitação na Produção de Xilanase	55

5.2.3 Estudo da Cinética de Xilanase versus Protease	56
5.3 Propriedades do Extrato Enzimático Bruto	58
5.3.1 Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanase	58
5.3.2 Efeito do pH na Atividade de Xilanase	60
5.3.3 Estabilidade Térmica de Xilanases	61
5.4 Modificação Química de Xilanases	63
5.5 Estudos de Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto por Enzimas	72
5.5.1 Tratamento de Polpas Kraft com Xilanases Comerciais e de <i>Aspergillus sp</i> 2M1 (Asperzyme 2M1)	72
5.5.2 Aplicação de Asperzyme 2M1 na Sequência de Branqueamento XAZQP de Polpas Kraft de Eucalipto	74
5.6 Tratamento de Efluentes	81
6. CONCLUSÕES	85
7. PERSPECTIVAS	87
8. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
10. APÊNDICE	110

ABREVIATURAS

A	Acidificação
AOX	Halogênio orgânico adsorvido
C	Cloração
D	Dióxido de cloro
Da	Dalton
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
E	Extração alcalina
GP	Grau de polimerização
O	Oxigênio
P	Peróxido de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
pNP	p-Nitrofenol
Q	Quelação
t_{1/2}	Meia-vida de uma reação
U	Unidades enzimáticas (μmol/min)
V	Viscosidade
X	Xilanase
Z	Ozônio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura Genérica de um Fragmento de Celulose	4
Figura 2:	Estrutura dos Precursores da Lignina: (I) Álcool p-hidroxi-cumarílico (II) Álcool coniferílico (unidade guaiacil) (III) Álcool sinapílico (unidade siringil)	5
Figura 3:	Estrutura Proposta para a Lignina por E. Adler (FENGEL & WEGENER	6
Figura 4:	Estruturas Básicas de Hemiceluloses de Madeiras Duras e Moles	8
Figura 5:	Típica Estrutura de Arabino-4-O-Metil-Glucuranoxilana (A) Ácido Ferúlico (B) Ácido Cumárico	10
Figura 6:	Alguns Sítios de Clivagem Enzimática de Xilanas	12
Figura 7:	Esquema Proposto por VIIKARI (1991) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft	24
Figura 8:	Esquema Proposto por PAICE <i>et alli</i> (1992) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft	25
Figura 9:	Variação da Atividade de Xilanase com a Temperatura de Incubação	54
Figura 10:	Cinética Xilanase x Protease	57
Figura 11:	Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanases de <i>Aspergillus sp</i> 2M1	59
Figura 12:	Efeito do pH na Atividade de Xilanases de <i>Aspergillus sp</i> 2M1	62
Figura 13:	Estabilidade de Xilanases a 55°C	64
Figura 14:	Efeito do Substrato na Estabilidade de Xilanases Induzidas por Xilanas de Pinus e Eucalipto	65

Figura 15:	Estabilidade de Xilanases a 40 °C	66
Figura 16:	Cinética de Inibição de Xilanases por EDC	69
Figura 17:	Determinação da Ordem de Reação - Relação Entre K_{ap} e EDC	70
Figura 18:	Proteção do Sítio Ativo por Xilotriose	71
Figura 19:	Efeito da Proteção da Viscosidade por Asperzyme nas Propriedades Físicas e Mecânicas das Polpas	77
Figura 20:	Comparação entre as Propriedades Mecânicas de Fibras de Celulose Tratadas por Branqueamento Convencional (DEDED) e por Branqueamento Com e Sem Etapa Enzimática	78
Figura 21:	Comparação entre a Resistência Final das Polpas Obtidas pelos Processos AZQP (sem xilanase) e XAZQP (com xilanase)	79
Figura 22:	Relação entre o Índice de Estouro e de Rasgo para Polpas Tratadas Com e Sem Xilanase	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Principais Componentes da Madeira	3
Tabela 2:	Condições Reacionais para Modificação de Grupos Funcionais do Sítio Ativo de Xilanases	41
Tabela 3:	Sequência de Branqueamento Totalmente Livre de Cloro	42
Tabela 4:	Condições gerais do Branqueamento XAZQP	42
Tabela 5:	Condições Experimentais da Sequência XOP	43
Tabela 6:	Seleção da Fonte de Carbono para Indução de Xilanases	51
Tabela 7:	Influência do Tipo de Xilana na Indução e Determinação de Xilanases	52
Tabela 8:	Efeito da Temperatura de Incubação	53
Tabela 9:	Efeito da Agitação e Estado Físico do Meio de Cultura	55
Tabela 10:	Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanase	58
Tabela 11:	Efeito do pH na Atividade de Xilanase	61
Tabela 12:	Meia-vidas para Xilanases de <i>Aspergillus sp</i> 2M1	61
Tabela 13:	Inativação de Xilanases por Reações com Grupos do Sítio Ativo	67
Tabela 14:	Atividades Enzimáticas de Xilanases Comerciais	72
Tabela 15:	Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto com Xilanases (5U/g) Utilizando a Sequência XOP	73
Tabela 16:	Seletividades do Processo XOP	73
Tabela 17:	Parâmetros das Polpas Tratadas Com e Sem Asperzyme 2M1	74
Tabela 18:	Seletividade de Asperzyme 2M1 e EnZone	75
Tabela 19:	Ensaio Físicos, Mecânicos e Óticos das Polpas	76
Tabela 20:	Análise dos Efluentes Originais na Sequência (-X)AZQP e XAZQP	82

Tabela 21:	Toxicidade (EC 50) de Polpas TCF pelo Método MICROTOX	82
Tabela 22:	Análise dos Efluentes da Sequência (-X)AZQP após Tratamento com <i>Lentinus edodes</i> UEC 2021	83
Tabela 23:	Análise dos Efluentes da Sequência (X)AZQP após Tratamento com <i>Lentinus edodes</i> UEC 2021	84
Tabela 24:	Toxicidade (EC 50) dos Efluentes após Biotratamento	84

RESUMO

Este estudo procurou determinar quais as condições ótimas para crescimento do fungo *Aspergillus sp* 2M1 e produção de xilanases. Também foram estudadas algumas propriedades destas enzimas visando posterior aplicação em etapas de branqueamento de polpas kraft de eucalipto.

As condições ótimas para crescimento do fungo e produção da enzima, tanto em placas contendo meio sólido como em incubadora com movimento rotatório para culturas líquidas, foram: xilana comercial tipo “birchwood” como fonte de carbono, temperatura entre 28 e 34 °C, pH 6,0 e agitação de 150 rpm para culturas líquidas. Não foi determinada a presença de celulases e a atividade enzimática de β -xilosidases foi pequena.

As xilanases estudadas mostraram atividade enzimática máxima em pH 6,0 e temperatura de 60°C, utilizando xilana de eucalipto como fonte de carbono indutora de enzimas. A estabilidade térmica destas enzimas sofreu grande redução com o aumento da temperatura, passando de aproximadamente 14 horas a 40°C para aproximadamente 10 minutos a 55°C.

Através de reações químicas com inibidores específicos verificou-se a participação do grupo carboxílico no sítio ativo destas xilanases. O estudo cinético mostrou uma ordem de reação próxima a 1 e a inibição da atividade enzimática por modificação do sítio ativo com 1-etil-3-(3-aminopropil)carbodiimida foi suspensa na presença de xilotriose.

As xilanases produzidas por *Aspergillus sp* 2M1 (Asperzyme 2M1) foram aplicadas em duas sequências de branqueamento de polpas kraft de eucalipto: (X)AZQP e (X)OP. Na primeira sequência os resultados obtidos com utilização da enzima foram similares ao controle sem xilanase, apresentando no entanto proteção da viscosidade final da fibra de

Na sequência XOP, o tratamento utilizando Asperzyme 2M1 foi comparado com dois outros utilizando as xilanases comerciais Cartazyme HS e Pulpzyme. Asperzyme apresentou resultados semelhantes à Cartazyme, protegendo a viscosidade e reduzindo o número kappa em relação ao seu controle, e foi superior à Pulpzyme.

Os efluentes gerados no branqueamento com ozônio (XAZQP) foram analisados segundo cor, lignina residual, fenóis totais, açúcares redutores e toxicidade (MICROTOX) e posteriormente tratados com o fungo *Lentinus edodes* UEC 2021 durante cinco dias. Os efluentes obtidos apresentaram alta toxicidade, que foi completamente removida após tratamento com o fungo.

SUMMARY

This study deals with the optimization for *Aspergillus sp* **2M1** growth and its xylanase production. Besides these aspects, some of the xylanase properties looking for an application in a bleaching Eucalyptus Kraft pulp were also studied.

The optimal fungal growth conditions and enzyme production, in solid as in liquid media were following: Birchwood xylan as carbon source, temperature between 28-34 °C, pH 6,0 and 150 rpm in the case of liquid cultures. No cellulase and very low β -xylosidase activities were found. The xylanase exhibited the maxima activity at pH 6,0 and temperature of 60°C, using Eucalyptus xylan as carbon source. The thermal stability of this enzyme underwent a large reduction with temperature increase, going from the average value of 14 h at 40°C to 10 min at 55°C.

Through chemical reactions with specific inhibitors the carboxilic group appeared as the important group at the active center of the xylanase from *Aspergillus sp* **2M1**. The kinetics study gave a first order reaction with a slope value equal to one and the inactivation due to 1-ethyl-3-(3-aminopropyl)carbodiimide was abolished in the xylotriase presence.

The xylanase from *Aspergillus sp* **2M1** (Aperzyme 2M1) was applied in two different bleaching sequences: (xylanase)-Acid-Ozone-Chelant-Peroxide [(XAZQP)] and (xylanase)-Oxygen-Peroxide [(XOP)]. In the first sequence the results with the utilization of the Aperzyme were similar to those in the control experiment, however, exhibiting a viscosity protection in the final fiber. The pulp physicommechanical properties appeared superior in the assays in which the enzyme was used.

In the XOP sequence, in which Aperzyme was used, the results with two commercial xylanases, as Cartazyme and Pulpzyme were compared. Aperzyme presented better

results than Pulpzyme and similar to Cartazyme, protecting the viscosity and reducing the kappa number related to the control experiment.

The effluent produced in the ozone sequence (XAZQP) were analyzed following the color, residual lignin, total phenols, reductant sugars and toxicity (MICROTOX) and after fungal treatment with *Lentinus edodes* UEC 2021 strain during five days. The effluent obtained either in the presence or absence of xylanase were extremely toxic, but after fungal treatment the toxicity was totally eliminated. Then, Asperzyme 2M1 appeared as a potencial one for industrial pulp bleaching.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente grande importância tem sido dada à questão ambiental dentro do desenvolvimento tecnológico e urbano. Neste contexto, nos últimos anos vem se desenvolvendo uma tecnologia menos poluente e de custo energético mais baixo, que tem o uso de enzimas e microorganismos como um de seus objetivos principais.

O setor de celulose e papel é um dos mais importantes da indústria brasileira, destacando-se no cenário internacional em função da qualidade e do volume de polpa de celulose que exporta. Ao mesmo tempo, este setor da indústria tem sido rotulado como um grande poluidor ambiental devido aos produtos organoclorados presentes em seus rejeitos, formados quando o cloro e seus derivados são utilizados no processo de branqueamento da polpa de celulose. Muitos destes compostos têm sido identificados como tóxicos, persistentes e bioacumulativos. Este problema fez com que recentemente surgissem leis internacionais que visam controlar a utilização destes agentes de branqueamento bem como, a médio prazo, eliminá-los completamente das plantas de branqueio das indústrias de celulose e papel.

Em resposta às pressões públicas e governamentais, o processo de branqueamento vem sendo modificado lentamente. O cloro foi substituído por dióxido de cloro e muitas indústrias já inseriram uma etapa de pré-deslignificação com oxigênio.

A utilização de enzimas em substituição a uma metodologia tradicional começou a ser estudada por volta de 1980 e dividiu-se basicamente em quatro áreas: utilização de microorganismos para degradar a lignina residual da polpa, tratamento da polpa com enzimas ligninolíticas extraídas destes microorganismos, utilização de sistemas biomiméticos e tratamento da polpa com enzimas hemicelulolíticas.

Nos últimos anos as enzimas mais estudadas para aplicação na etapa de branqueamento foram as xilanases . Muitas delas foram isoladas e caracterizadas, mas ainda pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. Seu principal atrativo está no fato de estas enzimas podem ser utilizadas em um curto período de tempo aproveitando o equipamento já existente nas indústrias. Estudos recentes procuram aplicar as xilanases em sequências de branqueamento totalmente livres de cloro, combinando o tratamento enzimático com oxidação por oxigênio, ozônio e peróxido de hidrogênio.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições para a produção de xilanases pelo fungo *Aspergillus sp* 2M1, avaliar as propriedades da enzima e posteriormente aplicá-la em duas sequências de branqueamento de polpas kraft de eucalipto totalmente livres de cloro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Componentes estruturais da madeira

A madeira é a matéria prima mais utilizada pela indústria 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 estes componentes estão intimamente associados ou quimicamente ligados entre si e aos vários componentes não estruturais (fenóis, terpenos, gorduras, alcalóides, esteróides, etc...)

De uma maneira geral as madeiras são classificadas em dois tipos: madeiras moles ou softwood e madeiras duras ou 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, 1984; HON & SHIRAISHI, 1991).

TABELA 1. Principais componentes da madeira (OSHIMA, 1965).

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

Celulose

É o maior componente da madeira, sendo um polímero linear formado exclusivamente por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β -1,4. 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 (FENGEL & WEGENER, 1984) (Fig. 1).

A análise 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 densamente empacotadas. No estado sólido existem pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose que levam à formação de estruturas supramoleculares arranjadas em um sistema ordenado parecidas às de cristais. A celulose amorfa aparece quando as cadeias se interligam de maneira caótica (FENGEL & WEGENER, 1984).

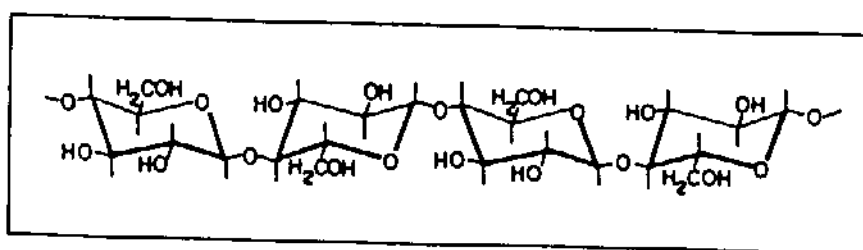


FIGURA 1. Estrutura Genérica de um Fragmento de Celulose.

Lignina

A lignina é um polímero tridimensional, altamente ramificado e de peso molecular elevado, composto basicamente de derivados dos álcoois sinapílico, coniferílico e p-cumarílico (Fig. 2).

O tipo de lignina varia de acordo com o tipo da madeira que a contém. Em madeira mole encontra-se predominantemente ligninas guaiacil, polímeros de álcool coniferílico. Ligninas de madeira dura são do tipo guaiacil-siringil, ou seja, são constituídas principalmente pelos copolímeros dos álcoois sinapílico e coniferílico (HARADA & CÔTÉ, 1985). Vários tipos de ligações são formadas, originando uma estrutura tridimensional bastante complexa (KANTELINEN, 1992) (fig. 3).

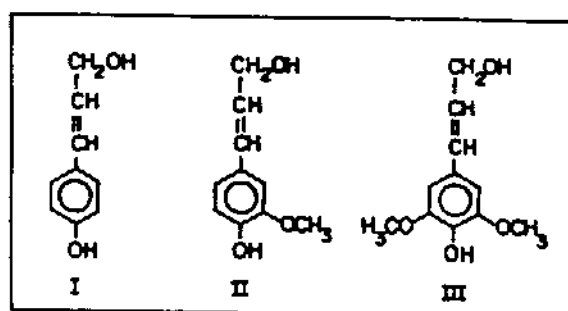


FIGURA 2. Estrutura dos Precursores da Lignina: (I) Álcool-p-hidroxycumarílico; (II) Álcool coniferílico (unidade guaiacil) e (III) Álcool sinapílico (unidade siringil).

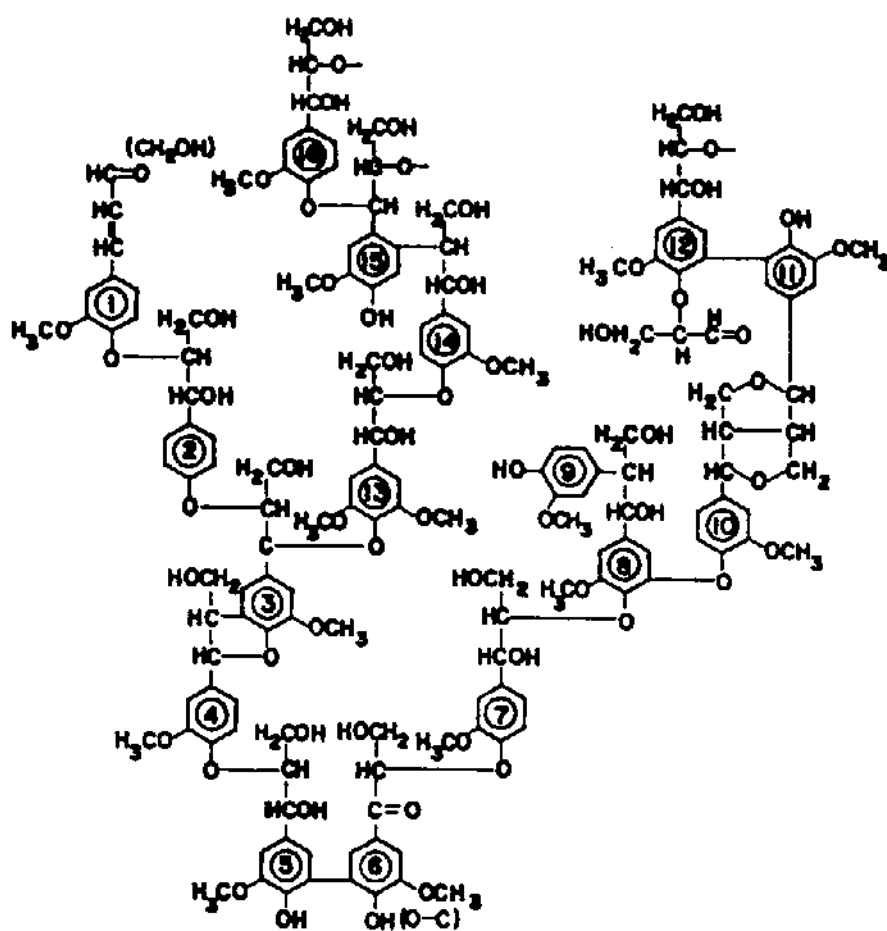


FIGURA 3. Estrutura Proposta para a Lignina por E. Adler (FENGEL & WEGENER,1984).

Hemiceluloses

As hemiceluloses consistem de uma mistura de polissacarídeos de baixo peso molecular intimamente associados à celulose (JANES,1969;WOODWARD,1984; DEKKER,1985).

A grande maioria das hemiceluloses apresenta ligações $\beta(1\rightarrow4)$ entre os seus componentes, exceto as que possuem galactose, cuja ligação é do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ (MAGEE & KOSÁRIC, 1985). Os açúcares que compõe as hemiceluloses são: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido D-galacturônico, ácido glucurônico e seus derivados (JANES, 1969). Hemiceluloses que possuem predominância de um desses açúcares também são chamadas genericamente de xilanas (xilose), mananas (manose), galactanas (galactose), etc...

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 (Fig. 4).

A hemicelulose predominante em madeiras duras é a O-Acetil-4-O-metil-glucuranoxilana, com substituições principalmente no C2 através de ligações $\alpha-1,2$ do ácido 4-O-metil-glucurônico (10 a 35%) e 70% dos C2 e C3 acetilados (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). A ligação do ácido glucurônico ao carbono 2 é resistente à hidrólise por ácidos (JANES, 1969).

As xilanas de madeira mole são exemplos mais complexos. Além da presença dos ácidos urônicos como nas madeiras duras, elas contém cerca de 10 a 15% de unidades L-arabinofuranosídicas. Este material não é acetilado e possui β -D-xilopirranose, ácido 4-O-metil-glucurônico e L-arabinofuranose na razão 100:20:13, com o ácido ligado às posições C2 e a L-arabinofuranose nas posições C3. As cadeias laterais arabinosil podem ter grupos ferúlicos ou p-cumarílicos em substituições na posição 5 (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993) (fig. 5).

2.2 Degradação enzimática de xilanas

Xilanas de diferentes fontes exibem variação na composição e estrutura e por isso precisam de ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais para serem degradadas (COUGHLAN & HAZLEWOOD,1993). Endo enzimas como as endo-1,4- β -D-xilanases hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose. Os oligossacarídeos liberados por esta hidrólise podem ser degradados por β -xilosidases. Exo enzimas, do tipo α -l-arabinofuranosidases, α -glucuranosidases e acetil esterases removem respectivamente do polímero os substituintes arabinofuranosil, ácido glucupiranosídeo e grupos acetil (BIELY,1985).

A degradação da hemicelulose requer ainda a utilização de dois tipos de esterases, ferúlico esterase e cumárico esterase, para remoção dos resíduos de ácido ferúlico e ácido cumárico (KATO & NEVINS,1985; SMITH *et alii*,1991 ; TENKANEN *et alii* ,1992) (fig.6).

Endo-(1,4)- β -xilanases

Endo-(1,4)- β -xilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de xilanas. Apesar da predominância de xilana nas hemiceluloses, apenas cerca de 20 - 25% desta pode ser hidrolisada por xilanases. Limitações difusionais devido ao tamanho relativo dos poros pode ser um fator para explicar tal fato. Tem sido também sugerido que a distribuição heterogênea da hemicelulose pode limitar a acessibilidade da xilana à enzima. Outras razões possíveis incluem baixa hidrolisabilidade da xilana devido à sua natureza, instabilidade térmica da enzima e inibição pelo produto final (ONYSKO, 1993).

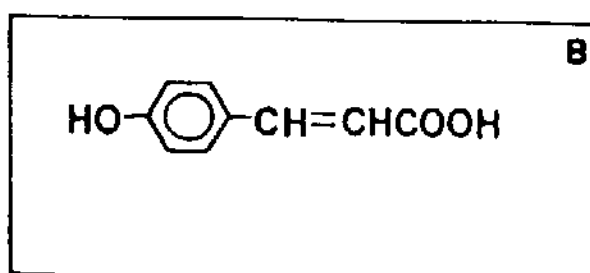
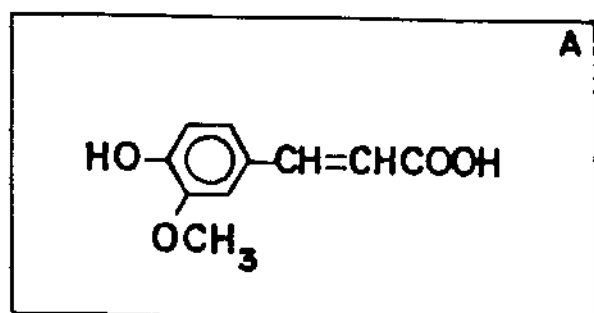
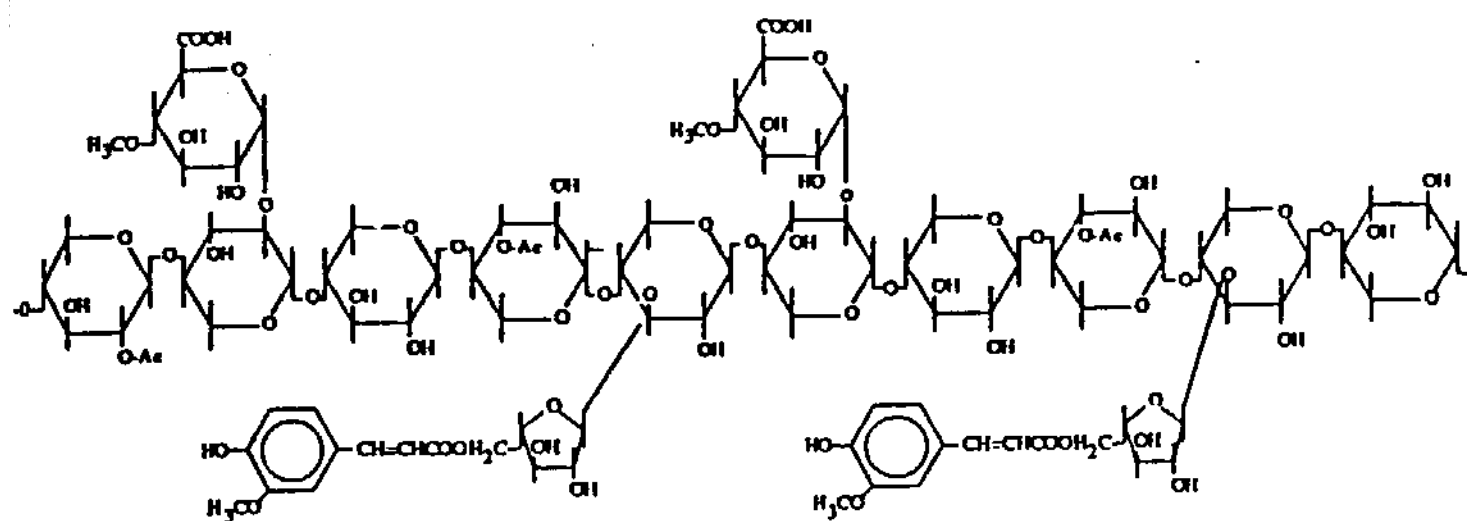


FIGURA 5. Típica Estrutura de Arabino-4-O-Metil-Glucuranoxilana. (A) Ácido ferúlico (B) Ácido cumárico.

Em geral, os polímeros de xilana são clivados por xilanases apenas em regiões não substituídas para dar uma mistura de xilooligossacarídeos não substituídos e xilooligossacarídeos substituídos por cadeias curtas e longas.

A degradação completa da xilana prossegue com o auxílio de outras enzimas, que clivam as cadeias laterais fornecendo novo substrato para as xilanases. Um exemplo claro desta sinergia é o que ocorre entre endo-xilanase, β -xilosidase e arabinoxilana-arabinofuranohidrolase na hidrólise de arabinoxilanas (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

Em contraste com a maioria das endo-xilanases estudadas, algumas destas enzimas requerem a presença de substituintes e hidrolisam a cadeia principal apenas nas ligações vicinais a estes. Nestes casos suspeita-se que a cadeia lateral possa acomodar o centro ativo da enzima, orientando o substrato no sítio ativo de modo que as ligações apropriadas sejam clivadas na cadeia principal. Um exemplo deste tipo de endo xilanase é a glucuranoxilana xilanahidrolase isolada de *Bacillus subtilis*, onde as cadeias laterais de glucuranose são pré-requisitos para hidrólise do polímero (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). Estas duas xilanases mostraram baixa atividade em xilooligossacarídeos lineares e nenhuma ação em xilana insolúvel destituída de cadeias laterais de arabinose. O produto de hidrólise não apresentou nenhum resíduo livre de arabinose, levando à conclusão de que estas enzimas hidrolisam a xilana apenas em pontos localizados próximos às cadeias laterais de arabinose. Alguns produtores de endo-(1,4)- β -xilanases recentemente estudados são *Aspergillus nidulans* (PIÑAGA *et alii*, 1994), *Choetonium globosum* (GANDHI *et alii*, 1994) e *Schizophyllum commune* (HOLTRICH & STEINER, 1994).

As endo-xilanases podem ser classificadas de três diferentes modos:

-Quanto aos produtos formados:

Segundo DEKKER & RICHARDS (1976) as endo-xilanases subdividem-se naquelas que não liberam arabinose de arabinoxilanas e nas que liberam arabinose deste substrato .

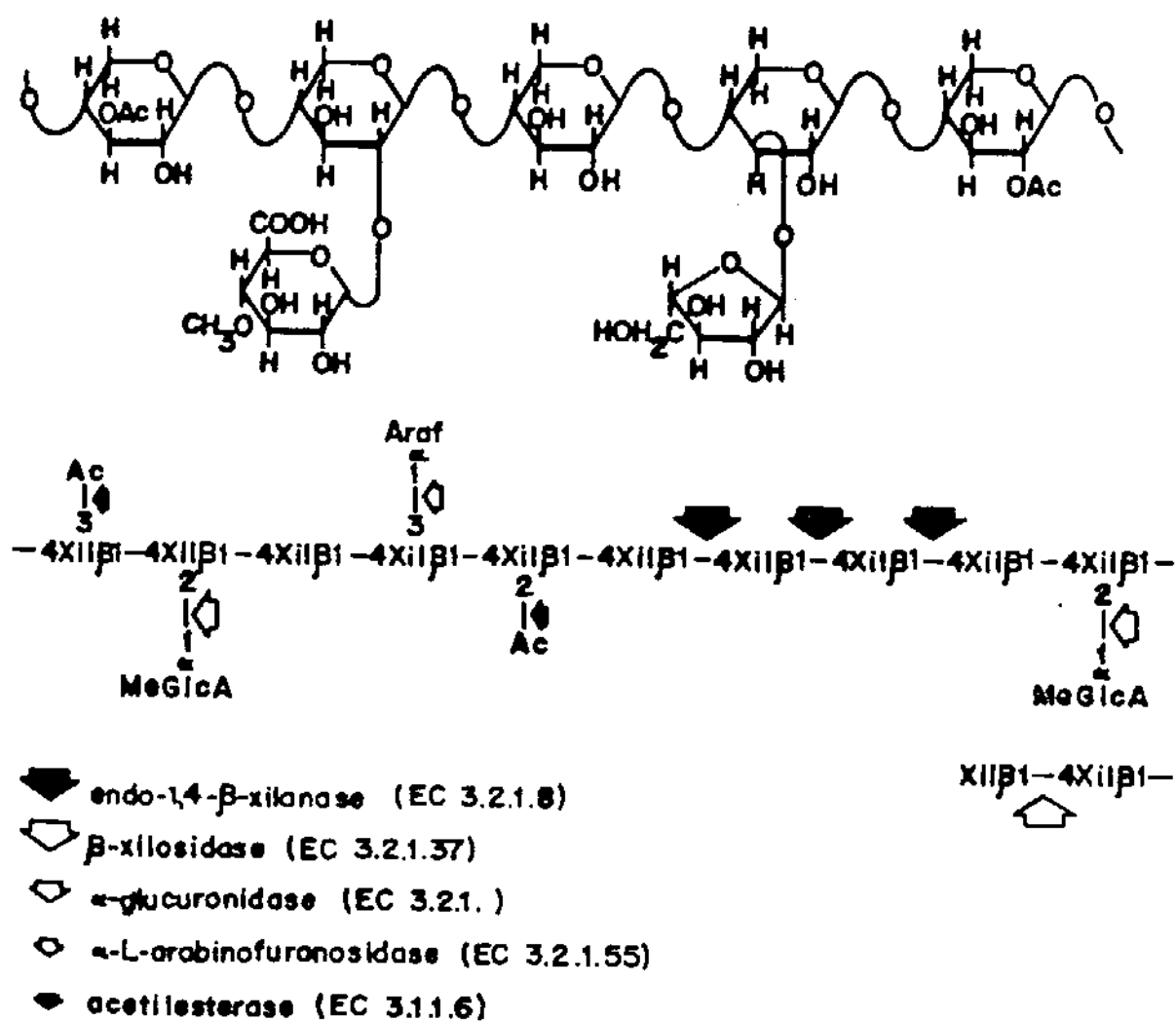


FIGURA 6. Alguns Sítios de Clivagem Enzimática de Xilanas.

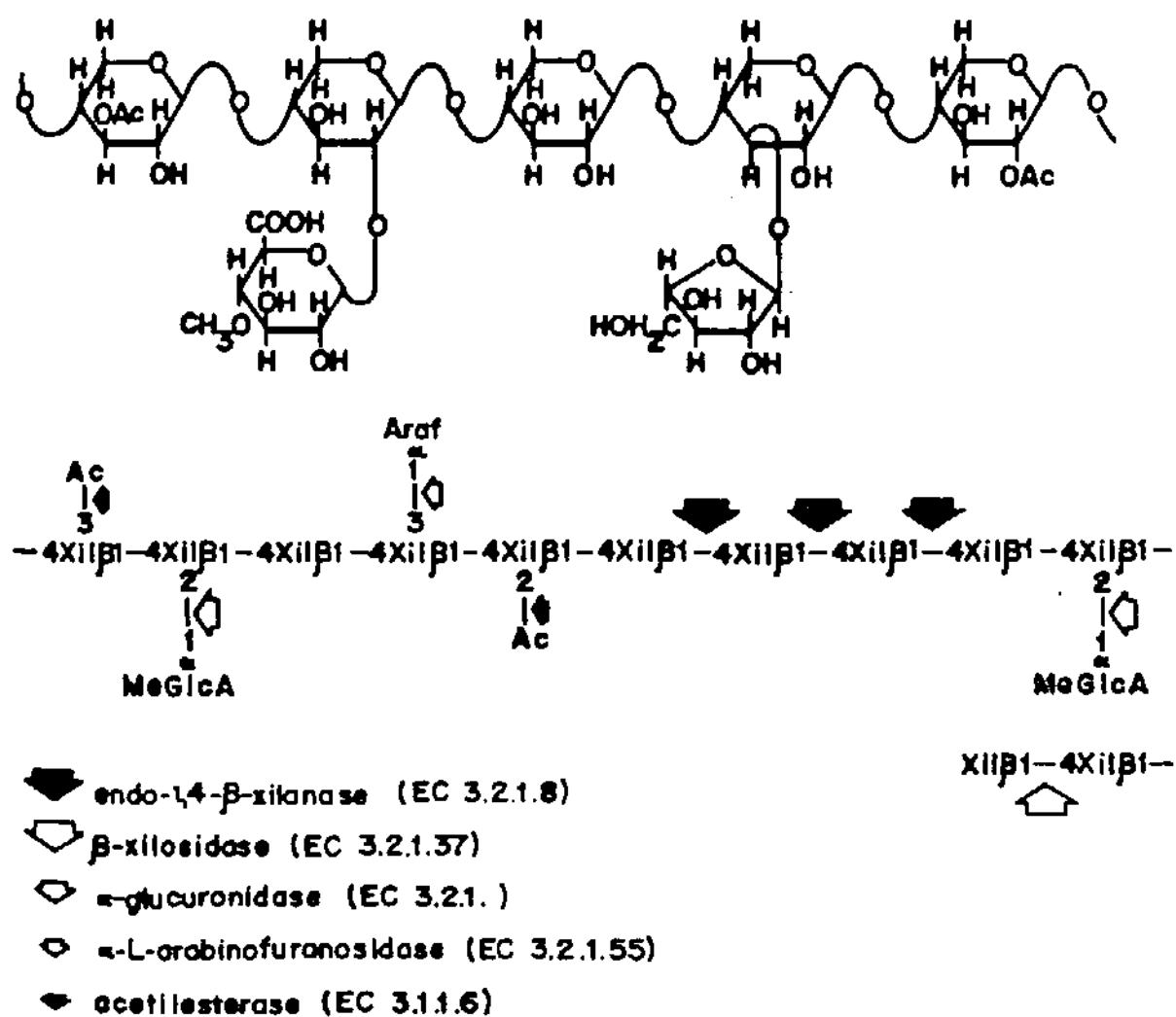


FIGURA 6. Alguns Sítios de Clivagem Enzimática de Xilanas.

Outra forma de classificação foi sugerida por REILLY (1981), onde estas enzimas foram subdivididas em quatro grupos. Dois deles foram capazes de hidrolisar pontos de ramificação mas diferiram no produto final. Os outros dois grupos não foram capazes de hidrolisar ramificações. Num deles a enzima produziu xilooligossacarídeos maiores que xilobiose e no outro os principais produtos foram xilobiose e xilose.

-Quanto à natureza do substrato:

Esta classificação baseia-se na habilidade das endo-xilanases em degradar xilana solúvel ou insolúvel. Duas xilanases de *Trichoderma reesei* apresentaram maior atividade com xilana insolúvel (LAPPALAINEN, 1986; WONG & SADDLER, 1992). Da mesma forma as endo-xilanases isoladas de *Clostridium stercorarium* hidrolisaram rapidamente xilana insolúvel (BERENGER *et alii*, 1985; SAKKA *et alii*, 1991). Outras duas xilanases de *Aspergillus niger* hidrolisaram preferencialmente xilana solúvel (FREDERICK *et alii*, 1985).

Alguns exemplos relacionam a maior eficiência de hidrólise da xilanase ao tamanho do substrato, como no caso de *Aspergillus oryzae* que apresentou uma endo-xilanase com maior afinidade por substratos de cadeias maiores (GP >200) e outra com preferência por substratos com baixo grau de polimerização (GP 30-40) (BAILEY *et alii*, 1991).

-Quanto ao ponto isoelétrico e peso molecular:

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

Xilanases já foram purificadas de numerosos microorganismos como bactérias, leveduras e fungos. Endo-xilanases de fungos têm pesos moleculares na faixa de 7 a 60 kDa e são geralmente mais ativas a pH entre 3,5 - 6,0 e 40 - 60 °C (TAN *et alii*, 1987;

BISWAS *et alii*, 1990; BAILEY *et alii*, 1991). As endo-xilanases bacterianas apresentam pesos moleculares na faixa de 15 a 85 KDa, geralmente são mais ativas em meios levemente alcalinos ou neutros (pH 5,0 - 8,0) e em temperaturas mais elevadas (50 - 90°C) (UCHINO & NAKANE, 1981; ESTEBAN *et alii*, 1983; NISHITANI & NEVINS, 1991; DAHLBERG *et alii*, 1993; RÄTTÖ *et alii*, 1994).

A inibição de endo-xilanases por diferentes compostos químicos específicos fornece informações sobre seu sítio ativo e sobre o mecanismo de catálise. Os íons metálicos Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Pb^{+2} , Zn^{+2} e Ag^{+} podem inibir alguns tipos de xilanases. O íon mercúrio, por ser o inibidor mais eficaz, sugeriu a presença de grupos tiol no sítio ativo da enzima (BASTAWDE, 1992). Efeito contrário foi mostrado pelos íons cálcio, manganês e zinco para uma endo-xilanase clonada em *Streptomyces sp* (KLUEPFEL *et alii*, 1992).

Estudos com reagentes alquilantes como p-clomercuribenzoato, N-bromosuccinamida, iodo e ácido iodoacético mostraram inibição da atividade enzimática, sugerindo que a enzima requer grupos -SH.

Ensaio realizados com xilanases de *Streptomyces*, *Bacillus* e *Chainia* (KESKAR *et alii*, 1989; DESPHANDE *et alii*, 1990), determinaram o envolvimento de resíduos de triptofano e cisteína nos sítios ativos . Foi demonstrado também que a adição de xilana juntamente com N-bromosuccinamida protege a xilanase de *Bacillus stearothermophilus* de inativação, indicando que o resíduo de triptofano estaria presente no sítio ativo da enzima, e não em outro sítio de ligação (KHASIN *et alii*, 1993). Recentemente foi comprovado o envolvimento de grupos carboxílicos no mecanismo de catálise de endoxilanases de *Schizophyllum commune* (BRAY & CLARKE, 1990) e de *Streptomyces sp* (MARUI *et alii*, 1993).

(1,4)- β -xilosidases

β -xilosidases são produzidas por uma variedade de fungos e bactérias e hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos a partir do terminal não redutor liberando xilopiranoses. Elas

podem ser proteínas mono ou diméricas com peso molecular na faixa de 60 a 360 kDa e pontos isoelétricos entre 3,3 e 7,3. Muitas destas enzimas catalisam a clivagem de substratos artificiais como p-nitrofenil- β -D-xilosídeo. Além da atividade hidrolítica muitas β -xilosidases têm uma alta atividade de transferase, o que provoca a formação de oligossacarídeos de peso molecular maior que o substrato original (REILLY, 1981).

A afinidade da enzima pelo substrato geralmente decresce com o aumento do grau de polimerização. As β -xilosidases de *Trichoderma reesei* (POUTANEN & PULS, 1988) e *Neurospora crassa* (DESPHANDE *et alii*, 1986) foram mais ativas quando utilizou-se p-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo como substrato. Em virtude de sua especificidade complementar, as β -xilosidases cooperam com as outras enzimas na degradação total da hemicelulose a monossacarídeos, convertendo completamente pequenos xilooligossacarídeos a xilose. Existem evidências de que algumas β -xilosidases não podem hidrolisar xilooligossacarídeos substituídos, como no caso de xilosidases de *Trichoderma reesei* que foram incapazes de utilizar xilooligossacarídeos arabinose-substituídos ou 4-O-metil-glucuranosil-substituídos como substrato (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

A atividade de β -xilosidases pode ser inibida por íons metálicos como mercúrio, zinco, cobre, manganês e prata. Xilose, glicose e arabinose podem também inibir a atividade enzimática (CLAEYSSSENS *et alii*, 1970a e b; RODIONOVA *et alii*, 1983; JOHN & SCHMIDT, 1988; LACHKE & DESPHANDE, 1988; SMITH *et alii*, 1991).

α -L-arabinofuranosidases

As α -L-arabinofuranosidases têm sido isoladas de cerca de uma dúzia de fontes diversas, que incluem plantas, bactérias e fungos. Muitas delas existem sob a forma monomérica, mas formas diméricas e até octaméricas, com pesos moleculares tão altos

como 495 kDa, já foram identificadas. O ponto isoelétrico destas enzimas varia bastante, situando-se entre 2,5 e 9,3.

As arabinofuranosidases atuam na clivagem de arabinoses lineares e ramificadas, arabinogalactanas, arabinoxilanas ou xiloligossacarídeos arabinose-substituídos e também em substratos artificiais do tipo de p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

α -Glucuronidasas

Estas enzimas são responsáveis pela clivagem das cadeias laterais de glucuranose e têm sido detectadas no suco digestivo de lesmas e numa variedade de fungos e bactérias.

As α -glucuronidasas auxiliam na conversão total de (arabino)-glucuranoxilanas a monossacarídeos. As análises estruturais da parede celular mostraram que grupos carboxílicos do ácido metil-glucurônico estão ligados a grupos hidroxilas da lignina, o que leva a uma possível aplicação da enzima no branqueamento de polpas de celulose (SMITH & FORSBERG, 1991).

α -Glucuronidasas foram detectadas em caldos de cultivo filtrados 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) e *Fibrobacter succinogenes* S₈₅ (SMITH & FORSBERG, 1991).

A enzima também foi detectada em dois outros fungos (PULS *et alii*, 1987) e apresentou em ambos os casos pesos moleculares elevados e atividade ótima em temperaturas elevadas e condições ácidas. A α -glucuronidase de *Agaricus bisporus* atuou sinergicamente com endo-xilanases na hidrólise da xilana. Os oligossacarídeos puderam ser hidrolisados por β -xilosidasas posteriormente à remoção dos resíduos dos ácidos 4-O-metil-glucurônicos (KHANDKE *et alii*, 1989).

Acetil-esterases

Estas enzimas hidrolisam ligações éster de alifáticos e aromáticos e removem grupos O-acetil de xilanas ou oligossacarídeos. Poucas acetil-esterases foram purificadas e em sua maior parte 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 em temperaturas entre 40 e 80°C (POUTANEN & SUNBERG, 1988; SUNBERG *et alii*, 1990).

Acetil esterases são importantes na degradação de xilanas acetiladas porque em geral os substituintes acetil impedem a ação de endo-xilanases (BIELY *et alii*, 1986). Dependendo do peso molecular do substrato e da especificidade da acetil-esterase uma distinção pode ser feita entre acetil esterase e acetil xilana esterase. Esta última 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 & SUNBERG, 1988; POUTANEN *et alii*, 1990; SUNBERG & POUTANEN, 1991).

2.3 Fatores que influenciam a produção de xilanases por microorganismos.

As xilanases excretadas pelos microorganismos podem ser constitutivas ou indutivas. Elas são constitutivas quando são sintetizadas pelos microrganismos independente da necessidade, em velocidade constante. São ditas indutivas quando ocorrem inicialmente em pequenas quantidades e aumentam sua concentração na presença de um determinado substrato.

As xilanases podem diferir em ocorrência e concentração dependendo das condições metabólicas da célula. Geralmente são enzimas indutivas, que podem ter sua síntese associada a mudanças nutricionais e favorecidas pelas condições de cultivo, pH e temperatura.

Fonte de carbono e energia

A fonte de carbono mais utilizada para obtenção de xilanases de microorganismos é a xilana comercial. Infelizmente seu uso fica restrito a estudos em laboratório, já que para a produção de xilanases em escala industrial ela é economicamente inviável. Em razão disto numerosos estudos têm sido realizados procurando matérias-primas mais baratas que possibilitem alto nível de produção da enzima.

Os melhores substratos encontrados até o momento foram os hidrolisados hemicelulósicos obtidos de madeira tratada ao vapor (SENIOR *et alii*, 1989) e resíduos de plantas como o farelo de trigo (BAILEY & POUTANEN, 1989).

O bagaço de cana-de-açúcar também vem sendo utilizado em diversos trabalhos com resultados promissores (DEKKER, 1983; CHAUDRI *et alii*, 1988; MILAGRES & LACIS, 1991; SAXENA *et alii*, 1991; KESKAR, 1992; KARNI *et alii*, 1993; MILAGRES *et alii*, 1993; MILAGRES & PRADE, 1994). Supõe-se que o bagaço, por ter uma constituição bastante heterogênea possa induzir além de endo-xilanases outras enzimas que atuem na degradação completa da xilana (MILAGRES & LACIS, 1991).

O tipo de microorganismo e a natureza da fonte de carbono podem alterar os níveis e o número de proteínas com atividade de xilanase (CHAUDARY & TAURO, 1982; BIELY, 1985; HRMOVÁ *et alii*, 1986; WILLIAMS & WITHER , 1992; KARNI *et alii*, 1993; OKEKE & OBI, 1993). Alguns fungos e bactérias produzem enzimas inespecíficas, com atividade conjunta de xilanase e celulase, sendo que esta inespecificidade é mais

frequentemente observada para as celulasas (JOHN *et alii*, 1979; LEE *et alii*, 1987; OKEKE & PATERSON, 1992).

O mecanismo que governa a formação das enzimas é influenciado pela disponibilidade de precursores da síntese de proteínas. Na falta de tais precursores ocorre a regulação separada da síntese de celulasas e xilanases pelas fontes de carbono disponíveis. Sendo assim, a obtenção de sistemas xilanolíticos, livres de celulase, utilizando fungos pode ser atingida cultivando os microrganismos em xilana totalmente pura, com baixa relação do conteúdo de nitrogênio e carbono. (HRMOVÁ *et alii*, 1986; BIELY *et alii*, 1986).

Oxigenação

Pesquisas recentes mostraram que a produção de xilanases é um processo dependente de oxigênio, tanto na fase de crescimento do microorganismo quanto durante o acúmulo da enzima. É importante que o oxigênio seja mantido em um nível que seja suficiente para evitar limitações ou diminuição da respiração normal dos microrganismos (GUSEK *et alii*, 1991).

Dentro deste contexto deve-se estudar as condições de agitação e aeração de culturas submersas, pois o problema do fornecimento de oxigênio durante a fermentação é muito complicado. A demanda de oxigênio pode variar de microorganismo para microorganismo e depender muito das condições utilizadas no processo. Foi demonstrado existir muitas relações entre variáveis mecânicas (agitação, transferência de oxigênio), propriedades do meio e parâmetros específicos do fungo (velocidade de crescimento, morfologia) (MITARD & RIBA, 1988; HOG *et alii*, 1994). Segundo Rodriguez *et alii* (1991) houve aumento na produção de xilanases de *Cellulomonas sp* quando o teor de oxigênio foi reduzido.

2.4 Aplicações industriais de xilanases.

Todo interesse em estudar-se os sistemas de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos. As pesquisas em busca de fontes alternativas de energia e de fornecimento de produtos químicos para a manufatura foram bastante impulsionadas na década de setenta por causa da crise do petróleo.

A biomassa, na sua forma natural ou em resíduos da agricultura e resíduos florestais ou desperdício das devastações, é gerada em muitas toneladas anualmente. Desde que esta biomassa é constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose, existe uma gama de pesquisas explorando esses recursos renováveis.

A aplicação de xilanases divide-se em duas categorias: Uma associada a polissacaridas (por exemplo celulasas) e outra livre de celulase. Como exemplo da primeira tem-se o uso de xilanases juntamente com celulase e pectinase na indústria alimentícia (BIELY, 1985) visando clarificação de sucos e vinhos, fabricação de pães (com objetivo de melhorar a textura da casca e do miolo e de aumentar o volume) e na etapa da filtração da cerveja rompendo sólidos em suspensão (VAN DER BROECK *et alii*, 1990). Na segunda categoria vemos a aplicação de xilanases nas indústria têxtil e de celulose e papel.

Xilanase adicionada à ração de aves e suínos aumentou sua digestibilidade (BRICE & MORRISON, 1991). Existe grande interesse em utilizá-la para produção de xilose, xilobiose e xilooligômeros que podem ser empregados como insumos para obtenção de xilitol ou ácido láctico por via fermentativa (WONG *et alii*, 1988; GILBERT *et alii*, 1992).

A utilidade mais recente e mais promissora de xilanases e enzimas xilanolíticas está no branqueamento de polpas de celulose para manufatura de papel. Estas enzimas também podem ser utilizadas em outras etapas de processo, como descorticamento, refino e dissolução das polpas, e em geral, reduzem o gasto de energia dos processos. (VIKARI, 1991).

Polpas dissolvidas são usadas na manufatura de acetato, celofane e rayon. Nestes casos a celulose deve ser totalmente pura sem qualquer resíduo de lignina ou hemicelulose (WONG & SADDLER, 1992). Uma proposta para este caso é a remoção da xilana residual com xilanases (PAICE & JURASEK, 1984).

2.5 Branqueamento de Polpas de Celulose

São necessários dois estágios para obtenção de uma polpa de celulose pura, própria para fabricação de papel: cozimento e branqueamento.

O processo de cozimento mais difundido é o Kraft, que envolve uso de sulfeto, bissulfeto e soda para degradar a lignina da madeira, deixando-a solúvel no licor de cozimento (PATEL *et alii*, 1993). A xilana é dissolvida no licor de cozimento devido a alta temperatura e pH. No entanto, 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 ainda estão escuras devido à presença de 3 a 5% de lignina. A coloração marrom adquirida pelas polpas ocorre devido a várias estruturas conjugadas que incluem catecóis, quinonas e outras substâncias que absorvem a luz visível. Para elevar a alvura da polpa é necessário que estas estruturas sejam removidas através de algumas etapas de branqueamento (VIIKARI, 1991; VIIKARI *et alii*, 1991; RÄTTÖ *et alii*, 1994; RAGOUSKAS *et alii*, 1994; ALLISON *et alii*, 1994).

O branqueamento da polpa kraft é feito em múltiplos estágios. Na primeira parte, chamada pré-branqueamento, a maioria da lignina é removida sem que ocorra um aumento significativo na alvura da polpa. A deslignificação se realiza tipicamente por reações de substituição e oxidação com cloro (C) ou dióxido de cloro (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 sequência através da aplicação de oxidantes tais como dióxido de cloro (D),

hipoclorito (H), peróxido de hidrogênio (P) e estágios de extração da polpa (BAJPAI & BAJPAI, 1992).

Como qualquer outra indústria de grande escala, a indústria de celulose e papel exerce seu impacto no meio ambiente, liberando um cheiro desagradável de enxofre e produzindo efluentes contendo substâncias que reduzem o nível de oxigênio de rios e lagos. Estas substâncias são resultado de reações entre a lignina presente nas fibras e o cloro utilizado no branqueamento. Alguns desses compostos evaporam, enquanto outros são arrastados e se agregam ao efluente (CARLBERG *et alii*, 1987; ONYSKO, 1993).

Alguns dos compostos organoclorados presentes nos efluentes são resistentes à degradação e podem permanecer muitos anos nos ecossistemas onde são despejados. Recentemente foi constatada a presença de dioxina, um dos compostos mais tóxicos conhecidos, em polpas kraft branqueadas com cloro molecular e em seu licor residual de branqueamento (MOUNTEER *et alli*, 1992).

Em 1989, uma nova legislação internacional propôs algumas regulamentações a respeito da descarga de organoclorados pela indústria de papel. Foram limitados os níveis de AOX (halogênio orgânico adsorvível), levando a alterações nos processos normais de cozimento e branqueamento. Foi proposto redução do número Kappa, tanto quanto possível, antes do branqueamento através de deslignificação com oxigênio e a substituição do cloro molecular por dióxido de cloro e outros oxidantes como oxigênio, peróxido de hidrogênio e ozônio (HELMING *et alii*, 1989; MACLEOD, 1991; MOUNTEER *et alli*, 1992).

Uma alternativa para eliminar o cloro molecular é o biobranqueamento, que baseia-se na adição de microorganismos ou enzimas como uma etapa de branqueamento.

2.5.1 Branqueamento com microorganismos

Na natureza a degradação da lignina é realizada pelas bactérias (ZIMMERMAN, 1990), algumas leveduras (JANSHEKAR & FIECHTER, 1983) e também pelos fungos ,

particularmente pelos fungos de decomposição branca. Desde 1979, quando Kirk e Yang reconheceram pela primeira vez que estes fungos poderiam ser utilizados para deslignificar polpas kraft não branqueadas, grande interesse tem sido despertado no uso de microorganismos no biobranqueamento de polpas.

Estudos com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* demonstraram redução do número Kappa em até 50-70% após 6-8 dias de tratamento. No entanto, foi constatada também uma perda considerável no conteúdo de celulose (KIRK & YANG, 1979). Tal fato foi atribuído à produção de celulasas pelo próprio microrganismo. A deslignificação por fungos aumentou a resposta da polpa ao branqueamento após 5 dias de tratamento, na modificação da sequência CEDED para FCED (FUJITA *et alii*, 1991).

A utilização dos fungos de decomposição branca na deslignificação é fortemente influenciada pelas condições de cultura como por exemplo: fonte de carbono, pH, temperatura, oxigenação concentração de nitrogênio, agitação e modo de cultivo entre outros. Porém 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; FUJITA *et alii*, 1991; SYKES, 1994). Outra dificuldade aparece na sua aplicação em escala industrial, com a necessidade de reatores muito grandes para suprir o consumo diário da fábrica.

Alternativa mais viável constitui a utilização dos filtrados de caldo de cultivo, mais fáceis de operar, necessitando de período de contato menor com a polpa e de custo reduzido (VIKARI *et alii*, 1987).

2.5.2 Branqueamento com enzimas hemicelulolíticas

É a alternativa mais estudada atualmente, e de todas as enzimas hemicelulolíticas as de maior interesse para estudos são as xilanases. Existem algumas evidências de que as hemicelulasas estão quimicamente ligadas à lignina da polpa e por isso criam uma barreira

física entre a lignina e os agentes de branqueamento (ONYSKO, 1993; THORNTON *et alii*, 1994). Com a finalidade de aumentar o contato da lignina com os reagentes oxidantes estuda-se a introdução de uma etapa de pré-branqueamento em que enzimas específicas são utilizadas para hidrolisar partes da hemicelulose e expor a lignina.

Uma teoria que tenta explicar a redução dos níveis de cloro nas etapas subsequentes à hidrólise da xilana menciona que o tratamento enzimático seria capaz de remover a xilana que reprecipita na superfície da polpa quando a alcalinidade do cozimento cai para valores de pH abaixo de 13. A remoção desta xilana provavelmente aumentaria a permeabilidade da fibra, deixando a lignina mais acessível aos reagentes oxidantes (VIAKARI,1991; SUURNÄKKI *et alii*, 1994; VIAKARI *et alii*, 1994; KANTELINEN *et alii*, 1994) (fig. 7).

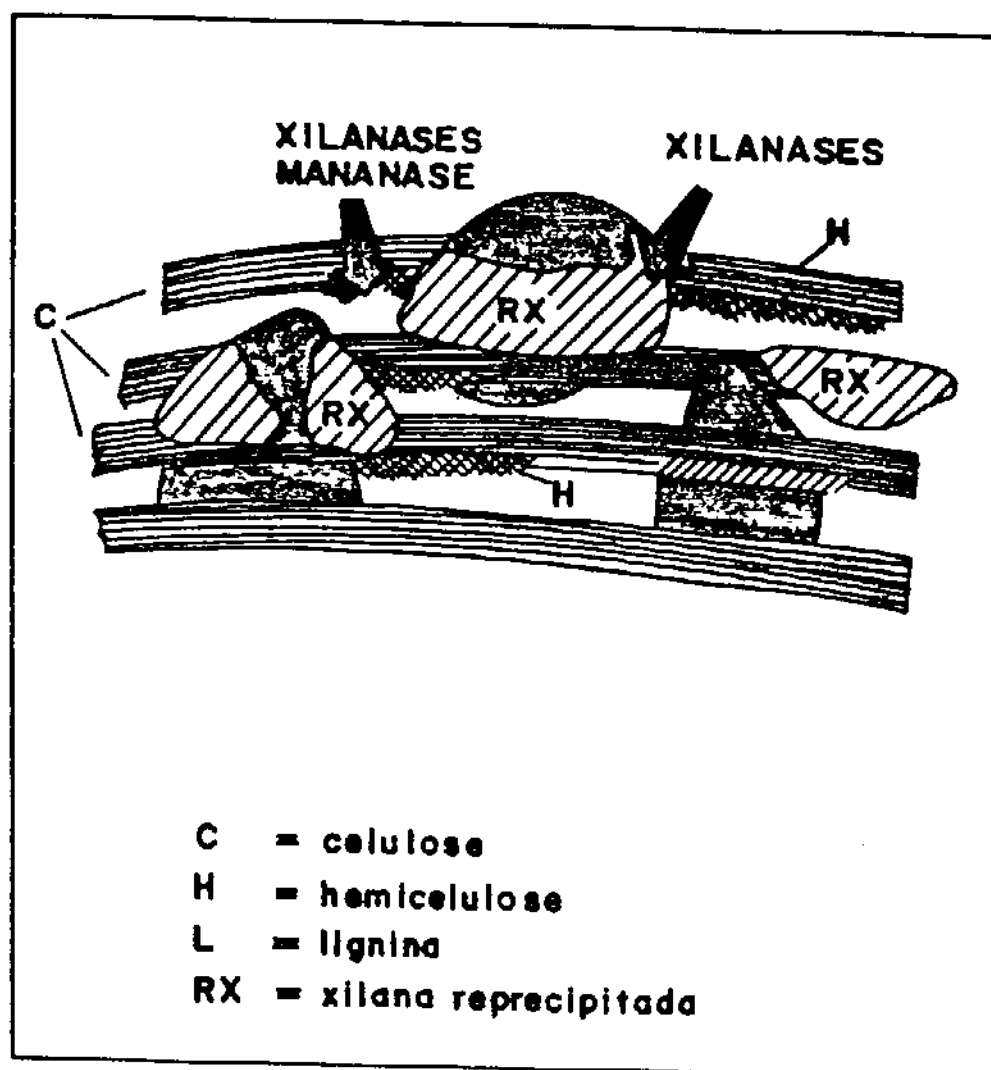


FIGURA 7. Esquema Proposto por VIAKARI (1991) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft.

Outra teoria, baseada em estudos estruturais, indica que na madeira a lignina está ligada a polissacarídeos (PATEL *et alii*, 1993). Algumas destas ligações são álcali-resistentes e não são hidrolisadas durante o cozimento kraft, fazendo com que certa quantidade de lignina residual permaneça ligada à hemicelulose após o cozimento (BUCHERT *et alii*, 1992). Neste caso, as xilanases hidrolisariam a xilana em pequenos fragmentos permitindo que a lignina associada a essas pequenas cadeias de hemicelulose seja mais facilmente removida através de sucessivas extrações (PAICE *et alii*, 1992; HORTLING *et alii*, 1994) (fig 8).

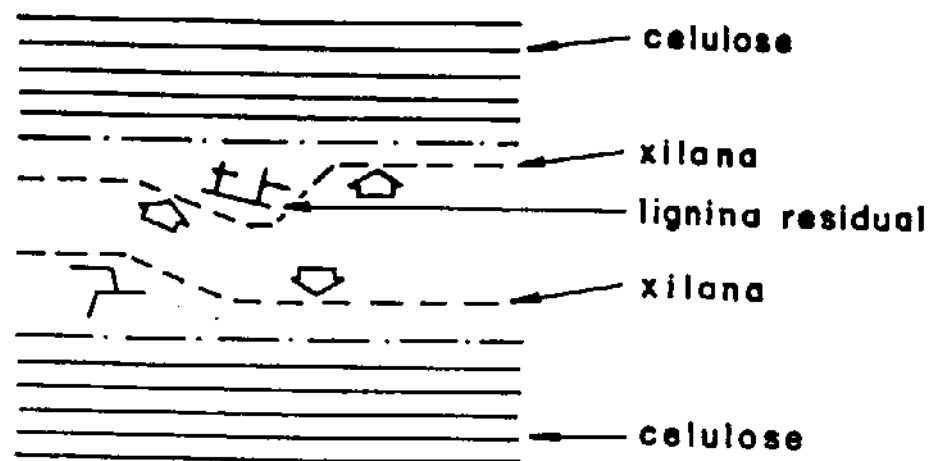


FIGURA 8. Esquema Proposto por PAICE *et alii* (1992) para o Mecanismo de Atuação de Xilanases em Polpas Kraft.

Ao contrário do branqueamento com microorganismos ou com enzimas ligninolíticas, a utilização de xilanases não causa aumento extraordinário na alvura ou diminuição expressiva do número Kappa da polpa. O efeito da hidrólise enzimática só é visível após o estágio de extração ou oxidação com os reagentes apropriados.

Clarck e colaboradores sugeriram que o mecanismo de branqueamento está relacionado ao processo de inchamento das fibras e que não há relação entre a extensão da remoção da hemicelulose e o aumento do branqueamento (CLARCK *et alii*, 1991). Seus resultados foram obtidos através da análise de açúcares solúveis, número Kappa e microscopia eletrônica de polpas kraft de pinus tratadas com xilanases e hidróxido de sódio ou mananase.

Alguns resultados do tratamento de polpas kraft com xilanases e posterior extração alcalina mostraram redução do conteúdo de lignina, correspondente a um decréscimo do número Kappa de 2 a 4 unidades relativamente à polpa não tratada (CHAUVET *et alii*, 1987; TOLAN & CANOVAS, 1992). A economia de agentes químicos é sempre reportada e o teor de cloro utilizado no branqueamento foi reduzido em 35-45% (SENIOR & HAMILTON, 1992), 25% (VIKARI *et alii*, 1987; CLARCK *et alii*, 1991) e 20 % (TOLAN & CANOVAS, 1992). Estudos com uma xilanase alcalina extraída de bactérias obtiveram ganho de 2 unidades na alvura após tratamento com um estágio de peróxido de hidrogênio (RÄTTÖ *et alii*, 1994). Sequências de branqueamento utilizando xilanases, ozônio e peróxido foram realizadas em madeiras duras e moles (YANG *et alii*, 1993; YANG *et alii*, 1994; ALLISON & CLARK, 1994).

Enzimas que hidrolisam cadeias laterais da xilana aumentaram moderadamente a acessibilidade dos substratos às xilanases, contribuindo no pré-branqueamento (VIKARI *et alii*, 1994). α -L-Arabinofuranosidases também têm sido estudadas para o auxílio na deslignificação com hemicelulases, mostrando-se promissoras (BEZALEL *et alii*, 1993). Outras hemicelulases não tiveram o mesmo sucesso das xilanases. Apesar de madeiras moles conterem alto grau de glucomananas, o tratamento com mananase não aumentou a extração de lignina da polpa kraft de pinus (CLARCK *et alii*, 1991). Segundo os autores, a maior parte da glucomanana se encontra nas camadas mais internas e portanto são menos

sucetíveis à ação das enzimas. No estudo de PAICE *et alii*(1988), β -xilosidases não tiveram efeito na extração da lignina.

Além de ganho na alvura e redução do número Kappa, o tratamento com xilanases vem mostrando proteção da viscosidade final da fibra, provavelmente devido a perda de xilana.

2.6 Tratamento de Efluentes

Durante o processo de produção da polpa de celulose vários efluentes são gerados, desde o descorticamento até a última etapa do branqueamento. Esses efluentes carregam uma gama de compostos químicos extraídos da madeira como resinas, hidrocarbonetos alifáticos, álcoois, ácidos, parafinas, terpenos, fenóis (todos extrativos da madeira) até lignina, organoclorados, taninos, quinonas e dioxinas liberados após cozimento e branqueamento.

Atualmente o tratamento de efluentes é feito em lagoas aearadas com bactérias e em biorreatores bacterianos anaeróbicos, em vários estágios (KROGERUS & HYNNINEN,1993; LESCOT & JAPPINEN, 1994; SUNDQUIST,1994). Os parâmetros de controle da qualidade dos efluentes normalmente determinados pelas indústrias são: DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), análise de fenóis e de AOX (halogênio orgânico adsorvível). Recentemente incorporou-se análise da toxicidade e de compostos orgânicos totais (PECK & DOLEY, 1994; TODESSE *et alii*, 1994).

Desde 1989 surgiram leis mais rigorosas quanto ao controle da emissão dos efluentes, o que impulsionou as pesquisas neste campo. Novos métodos como ultrafiltração, fotodegradação e tratamento biológico com fungos ligninolíticos têm sido estudados com a finalidade de desenvolver um sistema mais rápido, econômico e eficaz para diminuir a toxicidade dos efluentes gerados.

Estudos com uma bactéria fototrófica, *Rhodopseudomonas palustris*, mostraram eficaz metabolização de compostos aromáticos (RAHALKAR *et alii*, 1993). A bactéria foi capaz de metabolizar um certo número de compostos aromáticos em meios anaeróbicos luminosos e em meios aeróbicos sem luz.

Ainda pouco se sabe sobre o impacto do branqueamento biológico na qualidade do efluente. Em um estudo japonês (FUJITA *et alii*, 1991; JOHNSON, 1994) uma sequência de branqueamento com fungos reduziu a demanda química de oxigênio (DQO) e a cor da água residual em 50 e 80% respectivamente. Por outro lado, aparentemente fungos de decomposição branca não foram adequados para tratamento de seqüências EOP (BERGBAUER & EGGERT, 1994).

O pré-tratamento de polpas com xilanases também tem levado a reduções nos níveis de AOX (KOPONEN, 1990; SENIOR & HAMILTON, 1992) e dioxinas (ANÔNIMO, 1992). Após tratamento da polpa kraft com xilanase na sequência (CD)EDED, o valor de múltiplo de cloro molecular ($\%Cl_2$ / Kappa da polpa marrom) foi reduzido de 0,22 para 0,15, abaixo do nível requerido para formação de dioxinas e furanos (0,18-0,19) (MANOIR *et alii*, 1991). 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 8 vezes menor do que os valores obtidos nos branqueamentos convencionais (KOPONEN, 1990).

Os estudos para avaliar a toxicidade dos efluentes de seqüências totalmente livres de cloro ainda estão no começo, bem como a avaliação do impacto da utilização de enzimas nestes casos.

3. OBJETIVOS DA TESE

O objetivo geral deste trabalho é selecionar e caracterizar xilanases adequadas para uso específico no branqueamento de polpas kraft e observar sua influência nos efluentes obtidos nesses processos. As várias etapas deste estudo foram genericamente divididas em:

- Seleção das melhores condições para crescimento de *Aspergillus sp* 2M1 e produção de xilanase.
- Estudar o efeito de variáveis como pH e temperatura na atividade e estabilidade de xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.
- Estudar características do sítio ativo da enzima.
- Utilizar extratos enzimáticos obtidos do cultivo de *Aspergillus sp* 2M1 para tratamento de polpas kraft de eucalipto e posterior comparação com outras xilanases.
- Analisar e tratar biologicamente os efluentes obtidos em uma sequência de branqueamento escolhida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1) Microorganismo

O microorganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo *Aspergillus sp* 2M1 isolado de madeiras do sul do Chile na Universidade de Valparaíso - Chile.

4.1.2) Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, com exceção das fontes de carbono. Xilotriose foi preparada pelo Prof. Dr. D. Fontana, Departamento de Bioquímica, UFPR, Curitiba, PR.

4.1.3) Meio de Cultura e Manutenção do fungo

O meio de cultura básico utilizado em todas as fermentações foi o meio VOGEL (1956), constituído de: fonte de carbono (1%), citrato de sódio dihidratado (2,5 g/L), fosfato de potássio monobásico (5,0g/L), nitrato de amônio (3,0 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g/L). Micronutrientes: sulfato de zinco heptahidratado (5,0 mg/L), sulfato ferroso amoniacal pentahidratado (1,0 mg/L), sulfato de cobre pentahidratado (0,25 mg/L), sulfato de manganês dihidratado (0,05 mg/L), ácido bórico (0,05 mg/L), molibdato de sódio dihidratado (0,05mg/L) e ágar para meio sólido (2%).

As fontes de carbono utilizadas foram: xilana (tipo “birchwood”- SIGMA, xilana de pinus e eucalipto), farelo de trigo, casca de arroz e glicose.

Todos os nutrientes foram dissolvidos em tampão fosfato pH 6,0 50 mM, distribuídos em erlenmeyers de 125 mL na proporção 1:5 (vol liq./ vol. frasco) e autoclavados a 112°C e 15 minutos ou autoclavados e vertidos em placas de petri previamente esterilizadas do mesmo modo.

4.1.4) Enzimas Utilizadas nos Ensaios de Branqueamento

Utilizou-se a xilanase Asperzyme 2M1, produzida a partir do cultivo de *Aspergillus sp* 2M1 em xilana tipo birchwood e as xilanases comerciais Cartazyme HS e Pulpzyme, produzidas respectivamente pela Sandoz e pela Novo.

4.2. Métodos

4.2.1) Obtenção do Extrato Enzimático

a) meio sólido: ½ placa de meio sólido contendo fungo crescido, cultivado durante 5 dias em meio de cultura VOGEL (1956) já descrito, foi cortada em pequenos cubos e transferida para recipiente contendo 15 mL de tampão acetato pH 5,3 50mM. Após 15-30 minutos de agitação o caldo obtido foi centrifugado por alguns minutos, filtrado em papel de filtro e guardado em geladeira (CUROTTO *et alii*, 1993).

b) meio líquido: após crescimento do fungo, cultivado durante 5 dias sob agitação, o extrato enzimático foi obtido pela simples filtração do meio de cultura em membrana millipore 0,45 µm e guardado em geladeira.

4.2.2) Determinação Das Atividades Enzimáticas

a) Xilanase

A atividade de xilanase extracelular foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da 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 1g de xilana tipo birchwood comercial dissolvida em 80 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,3. A solução foi aquecida até a ebulição e após retornar à temperatura ambiente o volume foi completado para 100 mL com o mesmo tampão.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 19,8 g de hidróxido de sódio, 306,0 g de tartarato de sódio e potássio e 8,3 g de bissulfito de sódio em 1 L de água destilada, sob agitação constante. Após total dissolução dos reagentes foram adicionados 7,6 mL de fenol e o volume foi completo para 1,4 L com água destilada.

Um volume de 0,9 mL de xilana 1% foi colocado em tubos de ensaio e incubado em banho termostatzado na temperatura de 50°C durante 5 minutos. Em seguida foi acrescentado 100 µL de amostra contendo enzima apropriadamente diluída no tampão. Após 5 minutos adicionou-se 1,5 mL do reagente DNS e a mistura foi incubada durante 5 minutos em água fervente.

A reação foi paralisada com o esfriamento da solução em banho de gelo, sendo seguida da leitura da absorbância da solução a 540 nm (espectrofotômetros Beckman DU-70 e HITACHI DU-2000). Os aparelhos foram inicialmente calibrados com um branco contendo os mesmos reagentes, sendo que a enzima foi substituída por tampão ou foi previamente inativada através de seu aquecimento em água fervente durante 15 minutos.

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 corresponde à quantidade desta capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar redutor expresso por xilose por mL por minuto a 50°C.

b) β -Xilosidase

A atividade foi determinada segundo MURTY & CHANDRA (1991).O método é baseado na estimativa do p-nitrofenol (pNP) liberado a partir de p-nitrofenol- β -D-xilanopiranosídeo (pNPX).

Adicionou-se 0,1 mL de filtrado de cultura a 0,4 mL de solução 0,2% (p/v) de pNPX em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A reação foi conduzida por 30 minutos a 50°C. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio a fim de interromper a reação. As leituras de absorbância foram feitas em 440 nm 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 desta capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de pNP por minuto a 50°C.

c) Celulase

A atividade foi determinada incubando-se tiras de papel de filtro watman nº1 (50 mg) com 1mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 a 50 °C por 60 minutos (MANDELS *et alii*, 1976). A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de DNS.

A curva padrão foi feita a partir de glicose (1 a 5 mM). Definiu-se como uma unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de glicose por minuto a 50°C.

d) Proteases

A atividade de protease foi determinada segundo DOSORETZ *et alii* (1990a). O método baseia-se na reação da azocaseína com as proteases quebrando o complexo azo (CHARNEY & TOMARELLI, 1947).

A solução estoque de azocaseína foi obtida através de dissolução de 250 mg de azocaseína em 5 mL de bicarbonato de sódio 1% a 60°C. O pH foi ajustado para 8,3 e a solução foi diluída a 10 mL com água destilada (CHARNEY & TOMARELLI, 1947).

Em um tubo de ensaio foram colocados 1 mL de solução de azocaseína e 1 mL do extrato enzimático. A mistura foi incubada a 38°C durante 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 1,8 mL de ácido tricloroacético 5%. A solução obtida foi centrifugada a 7000 rpm durante 8 minutos e filtrada. Misturou-se 1 mL desta solução com 1 mL de hidróxido de sódio 0,5 N e a absorbância foi lida a 440 nm.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade desta que catalisa a quebra do complexo azo causando mudança de 0,001/min na absorbância da solução.

Preparação da Azocaseína: dissolveu-se 5g de caseína em 100 mL de solução de bicarbonato de sódio 1%. Em outro recipiente 0,5g de sulfanilamida foram dissolvidos em 20 mL de solução aquosa de NaOH 0,15 N. À mistura sob agitação foram adicionados 0,22g de nitrito de sódio e 1,8 mL de solução aquosa de HCl 5N. Em seguida adicionou-se 1,8 mL de solução aquosa de NaOH 5N. Misturou-se a solução de caseína com a solução de sulfanilamida e a azocaseína foi precipitada levando-se o pH lentamente para 4,5. O precipitado foi lavado com água destilada e etanol e seco ao ar.

4.2.3) 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 de proteína foi calculada pela curva de calibração com albumina bovina, nas concentrações de 2 a 10 µg/mL. O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 10 mg do reagente Azul de Comassie Brilhante em 5 mL de etanol 95%. Em seguida foram adicionados 10 mL de ácido fosfórico 85% e o volume final foi completado para 100 mL com água destilada.

Todas as determinações enzimáticas foram realizadas em duplicata.

4.2.4) Preparo do Inóculo

As culturas de *Aspergillus sp* 2M1 foram mantidas em meio de cultura sólido, usando xilana como fonte de carbono, à temperatura ambiente (25-30 °C).

Para o preparo do inóculo uma porção de esporos foi transferida, com auxílio de alça de platina, do estoque para novas placas ou para erlenmeyers no caso de culturas líquidas.

4.2.5) Preparação das Xilanas de Pinus e Eucalipto

A xilana de madeira mole foi extraída da espécie *Pinus radiata* pelo laboratório de recursos naturais da Universidade de Concepción - Chile, e seguiu metodologia de TIMELL (1965).

Para extração de xilana de madeira dura foi utilizada a espécie *Eucalyptus grandis*. Pequenos cavacos da madeira foram triturados em um moinho com peneira de 40-60 mesh, obtendo-se um farelo fino que foi levado à refluxo com etanol absoluto durante cerca de 3 horas para eliminação dos extrativos da madeira.

Aproximadamente 300 g de madeira livre de extrativos foi suspensa em 5 litros de água destilada aquecida a 70-80°C, sob agitação constante. 33 mL de ácido acético e 98 g de clorito de sódio foram adicionados nesta ordem e a reação prosseguiu com agitação vigorosa. Após 1 hora a mesma quantidade dos reagentes foi adicionada e o procedimento foi repetido até o tempo total de reação de 7 horas. Terminada a oxidação o material foi deixado a decantar durante a noite. Em seguida o material sólido foi separado da solução reacional através de filtração à vácuo, foi lavado muitas vezes com água, até ficar livre de ácido, e depois com etanol e seco ao ar.

A holocelulose obtida (cerca de 70% de rendimento) foi suspensa em 2 litros de solução aquosa 24% de hidróxido de potássio em um erlenmeyer e posteriormente o sistema foi purgado com nitrogênio e tampado. A reação segue, sob agitação, durante 8 horas à temperatura ambiente. Terminada a extração da hemicelulose a mistura reacional ficou em repouso durante uma noite. O resíduo sólido foi recolhido por filtração à vácuo e lavado com cerca de 1,5 litros de água. O extrato de solução de hidróxido de potássio foi combinado com a água de lavagem e a mistura foi despejada em 4 vezes seu volume de etanol contendo aproximadamente 1,5 litros de ácido acético. O precipitado formado corresponde à 4-O-metilglucuranoxilana, que foi coletada por filtração à vácuo e lavada sucessivamente com etanol 70%, etanol absoluto e éter de petróleo e seco em dessecador à vácuo (TIMELL,1965).

4.2.6) Efeito da Temperatura de Incubação na Produção de Xilanase

A temperatura ótima para crescimento do fungo e produção de xilanase foi determinada cultivando-se o microorganismo em meio sólido nas temperaturas de 28, 34, 40 e 50°C. Após 5 dias de incubação foi obtido o extrato enzimático de cada cultura e a atividade de xilanase foi determinada.

4.2.7) Influência da Fonte de Carbono e Nitrogênio

Culturas sólidas de *Aspergillus sp* 2M1 foram incubadas a 30°C durante 5 dias, utilizando glicose, casca de arroz, farelo de trigo e xilana (“Birchwood”-SIGMA) como fonte de carbono. A quantidade de nitrogênio disponível foi de 1,0 g/L, 3,0g/L e 5,0g/L de NH_4NO_3 . Terminado o período de incubação foi determinada a atividade de xilanase.

4.2.8) Influência do Estado Físico do Meio de Cultura e da Agitação na Produção de Xilanase.

O efeito do estado físico do meio de cultura sobre a produção da enzima foi verificado cultivando o fungo em meios sólidos e líquidos a 30°C, utilizando xilana como fonte de carbono. A atividade da enzima foi determinada após 5 dias de incubação.

Para determinação do efeito da agitação, culturas líquidas do fungo foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sem agitação e com agitação de 150 rpm. Terminado o período de incubação determinou-se a quantidade de xilanase excretada.

4.3 Propriedades do Extrato Enzimático Bruto.

4.3.1) Efeito do pH na Atividade de Xilanase

O pH ótimo para atividade da xilanase foi determinado utilizando xilana tipo birchwood como substrato e xilana de eucalipto, obtida em nosso laboratório

(TIMELL,1965), como fonte de carbono para o fungo . Os tampões utilizados na concentração 50 mM foram: acetato de sódio nos valores de pH 4,0; 5,0; 5,5 e fosfato nos valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0. Aliquotas do extrato enzimático foram apropriadamente diluídas nestes tampões e para cada pH obtêve-se uma solução de xilana. A atividade de xilanase foi determinada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente.

4.3.2) Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanase

A temperatura ótima para atividade enzimática de xilanase, tendo xilana de eucalipto como fonte de carbono indutora, foi determinada incubando-se aliquotas de 0,1 mL de extrato enzimático com 0,9 mL de solução 1% de xilana tipo birchwood durante 5 minutos nas temperaturas de 30\40\50\55\60 e 70°C. A atividade enzimática foi então determinada em todas as temperaturas como já descrito anteriormente.

4.3.3) Cinética Xilanase X Protease

Culturas sólidas de *Aspergillus sp* 2M1 foram incubadas a 30°C durante 15 dias. A cada 24 horas obtêve-se um extrato enzimático e as atividades enzimáticas de xilanase e protease foram determinadas.

4.3.4) Estabilidade Térmica da Xilanase

A estabilidade térmica foi determinada pré-incubando o extrato enzimático nas temperaturas de 55 e 40°C durante 0 a 15 min e 0 a 24 horas respectivamente. Durante a

incubação térmica alíquotas do extrato foram retiradas e transferidas para banho de gelo e a atividade da enzima foi determinada normalmente.

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

$$\begin{aligned} \%A &= \%A_0 e^{-kt} && \text{onde , } A_0 = \text{atividade enzimática inicial} \\ & && e \\ \ln \%A / \%A_0 &= -kt && A = \text{atividade enzimática residual} \\ t_{1/2} &= 0,693/k \end{aligned}$$

onde o valor da constante k foi obtido a partir dos valores do coeficiente angular das retas formadas através do gráfico de logaritmo natural da % de atividade enzimática residual pelo tempo de pré-incubação.

Nos ensaios de estabilidade térmica as fontes de carbono e o substrato para determinação da atividade enzimática foram combinações de xilanas de “birchwood” (abeto), “oat” (aveia), pinus e eucalipto.

4.3.5) Modificação Química e Grau de Inativação de Xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.

O estudo do sitio ativo de xilanases foi realizado segundo metodologia proposta por MARUI *et alii* (1993). A tabela a seguir mostra os reagentes usados e as condições reacionais.

Um extrato enzimático obtido do cultivo do fungo durante 5 dias foi separado em alíquotas, que foram previamente incubadas com os reagentes relacionados na tabela 2.

Para cada ensaio foi feito um branco, pré-incubado nas mesmas condições, na ausência dos inibidores.

No estudo do grau de inativação da enzima, amostras do extrato enzimático foram tratadas com diferentes concentrações de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) durante tempos definidos e a atividade residual foi determinada em seguida.

Através do gráfico semi-log das percentagens residuais de atividade versus o tempo de incubação com EDC foram determinados os coeficientes angulares das retas obtidas para cada concentração. Um novo gráfico, log-log, destes coeficientes versus a concentração de EDC forneceu a estimativa da ordem de reação.

Todo o procedimento acima descrito foi repetido com uma xilanase semi-purificada de *Aspergillus sp* 2M1 e os resultados foram comparados.

A proteção do sítio ativo pelo substrato foi investigada tratando alíquotas do extrato enzimático com xilotriose na concentração final de 100 mM, na ausência e na presença de EDC 100mM. As condições reacionais foram as mesmas estipuladas para tratamento com EDC na tabela 2.

4.4 Polpa

Utilizou-se em um dos ensaios a polpa sulfato marrom (kraft) de eucalipto, já pré-branqueada com oxigênio, número kappa inicial 9,0, viscosidade 869 cm³/g ou 23 cp e consistência de 34%, produzida pela indústria de papel e celulose Riocell S.A, Guaíba, R.S. Todas as condições experimentais seguiram metodologia otimizada de Yang *et alii* (1993).

Na outra sequência de branqueamento foi utilizada a polpa sulfato marrom (kraft) de eucalipto, número Kappa inicial 18, viscosidade 25 cp e consistência de 21 %, produzida pela indústria de papel e celulose São Simão, Jacaréi, S.P.

Tabela 2. Condições reacionais para modificação de grupos funcionais do sítio ativo de xilanases.

REAGENTES	Concentração	CONDIÇÕES REACIONAIS
EDC	100 mM	tampão acetato 0,1 M pH 4,75, 25°C , 60 min e 0,7 M NaCl.
NBS	0,1 mM 0,5 mM	tampão acetato 0,1 M pH 4,0 , 25°C e 30 min.
Azul de Metileno	25 µM	tampão fosfato 25 mM pH 7,0 10°C e 60 min.
Iodoacetato	10 mM	tampão citrato 0,1 M pH 6,0 ; 25°C e 75 min.
2,3-Butanodiona	10 mM	tampão borato 50 mM pH 8,5 ; 20°C e 60 min.
N-Acetilimidazol	5 mM	tampão barbital 50 mM pH 7,5 ; 25°C e 60 min.
Cloramina - T	1,7 mM	tampão tris 0,1 M pH 8,5 ; 25°C e 20 min.

Aliquotas do extrato enzimático e de enzima semi-purificada (0,4mg/mL) foram incubados nas condições acima, na presença e ausência dos inibidores, sendo determinada a atividade enzimática de xilanase a seguir.

*EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

** NBS = N-bromosuccinimida

4.4.1) Experimentos de Branqueamento

Foi realizada a sequência de branqueamento XAZQP definida na tabela 3. com a polpa cedida pela Riocell S.A. As condições de cada etapa podem ser vistas na tabela 4. O branqueamento iniciou com 150g de polpa seca, sendo retiradas amostras de 25g de polpa seca para as análises ao final dos estágios X,Z e P. À polpa inicial adicionou-se o volume desejado de enzima e acrescentou-se água para atingir a consistência de 10%. A mistura foi colocada em sacos de polietileno e incubada em banhos termostatizados. Terminado o tempo de incubação o efluente gerado foi recolhido e a polpa foi exaustivamente lavada com água e filtrada à vácuo. O procedimento foi semelhante para todas etapas com exceção

do tratamento com ozônio. No estágio da oxidação pelo ozônio foi retirada água da polpa até a consistência de 40% e o tratamento foi realizado em rotovapor ligado a um ozonizador.

O experimento controle foi realizado de maneira idêntica, apenas removendo a aplicação da enzima no primeiro estágio.

Tabela 3. Sequência de branqueamento totalmente livre de cloro.

NOTAÇÃO	SIGNIFICADO
X	Tratamento enzimático com xilanase
A	Acidificação
Z	Branqueamento com ozônio
Q	Tratamento com quelante (DTPA)
P	Branqueamento com H_2O_2

Tabela 4. Condições gerais do branqueamento XAZQP.

CONDIÇÕES	Xasp.	A	Z	Q	P
peso seco polpa	150 g	75 g	75 g	50 g	50 g
consistência de trabalho	10 %	10 %	40 %	10 %	10 %
carga de enzima	4 U/g				
volume de enzima	6,9 mL				
tempo de retenção	90 min			60 min	180 min
temperatura, °C	50	ambiente	ambiente	60	70
pH inicial	5,5	2,0	2,0	5,0	11,0
% H_2O_2					1 %
consumo máx. O_3			0,79 %		
% silicato					2 %
% DTPA				0,2 %	

A outra sequência de branqueamento consistiu em duas etapas: tratamento com xilanases e tratamento com oxigênio e peróxido de hidrogênio (sequência XOP). As

condições experimentais do branqueamento podem ser vistas na tabela 5. Inicialmente a polpa foi colocada em um balão para rotovapor e as condições foram ajustadas para a adição da enzima. Após adicionar o volume necessário de enzima adicionou-se água de forma a se alcançar a consistência desejada e a mistura foi levada a reagir no rotovapor.

Para o estágio com oxigênio foram adicionados à polpa todos os reagentes conforme especificado na etapa. A consistência foi ajustada pela adição de água e a mistura foi homogeneizada manualmente. A mistura foi transferida para um reator que foi purgado com nitrogênio e aquecido até a temperatura desejada. Quando a temperatura de reação foi alcançada o nitrogênio foi descarregado e o oxigênio injetado no reator até obter a pressão desejada. Para o tratamento com peróxido as polpas foram colocadas dentro de sacos de polietileno acrescentando-se os reagentes e o volume de água necessário até atingir a consistência desejada, e depois incubadas por determinado período em banhos termostatizados.

Esta sequência foi repetida com as xilanases comerciais Cartazyme e Pulpzyme e para cada enzima foi realizado um experimento controle separado. A quantidade de polpa inicial foi de 40g de polpa seca e ao final de cada etapa foram medidos o número Kappa e a viscosidade.

Tabela 5. Condições Experimentais da Sequência XOP

CONDIÇÕES	X Asperz.	X Cartaz.	X Pulpz.	O	P
consistência trabalho	5%	5%	5%	12%	12%
carga de enzima	5 U/g	5 U/g	5 U/g	-	-
volume de enzima	0,55 mL	3,4 µL	4,5 µL	-	-
tempo de retenção	180 min	180 min	180 min	60 min	60 min
temperatura/ °C	50	50	50	100	65
pH inicial	5,5	5,0	5,5	-	11,2
NaOH / %	-	-	-	1,7	-
Oxigênio / kgf cm ⁻²	-	-	-	1,7	-
H ₂ O ₂ / %	-	-	-	-	1

4.4.2) Controle dos processos de branqueamento

a) Tratamento com Ozônio

O ozônio foi ministrado à polpa através de um ozonizador. Para controlar o processo de forma que o consumo de ozônio não ultrapassasse 0,79%, a quantidade deste (em mg) foi monitorada por titulação com tiosulfato de sódio. Inicialmente determinou-se a vazão do gás fazendo-o passar por uma solução de iodeto de potássio durante 30 segundos e titulando a solução logo em seguida. Sabendo-se que nem todo ozônio é consumido pela polpa estipulou-se uma carga de injeção de 1%. Com base na vazão do gás determinou-se o tempo de exposição da polpa ao agente de branqueamento, como pode ser visto nos cálculos abaixo.

$$\text{vazão do gás} = 1,55 \text{ mg O}_3 / \text{seg.}$$

$$1,0 \% \text{ ozônio} = 1000 \text{ mg em } 100 \text{ g de polpa.}$$

$$1,55 \text{ mg} \rightarrow 1 \text{ seg}$$

$$1000 \text{ mg} \rightarrow x$$

$$x = 10 \text{ min e } 46 \text{ seg.}$$

Após passar ozônio durante o tempo determinado, o gás residual foi coletado em kitassatos contendo solução de KI e titulado com tiosulfato. Sabendo a quantidade inicial de gás injetada e a não consumida pela polpa obtêve-se a quantidade real aplicada.

b) Determinação do Número Kappa

Uma quantidade variável de polpa seca, entre 0,5 e 1,0 g, foi desintegrada em 10 mL de água destilada até ficar livre de dos grumos e dos feixes de fibras não dispersas. Em

seguida as polpas foram transferidas para um erlenmeyer de 300 mL com lavagens sucessivas do recipiente com 140 mL de água destilada. O erlenmeyer contendo as fibras foi colocado em banho termostatzado a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, assegurando a constância da temperatura durante toda a reação. A suspensão permanece sob agitação constante, produzindo um vórtice controlado para não introduzir ar na mistura.

Pipetou-se 25 mL de solução de permanganato de potássio (KMnO_4) $0,1000 \pm 0,0005$ M em um erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico 4 M. Esta solução foi transferida para o erlenmeyer com a polpa cronometrando-se 10 minutos. O erlenmeyer com a solução de permanganato foi lavado com água destilada e este volume adicionado à mistura reacional.

Passado os 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 tiossulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $0,1000 \pm 0,0005$ M imediatamente após sua mistura à reação, mas sem filtrar as fibras, até que a solução ficasse com uma tonalidade amarelo claro. Adicionou-se então, duas gotas de solução de amido e prosseguiu-se com a titulação até a viragem da cor de azul para branca.

O branco foi realizado pelo mesmo procedimento na ausência da polpa.

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

$$K = \frac{P \times f(p) \times f(t)}{W}$$

$$P = \frac{(b-a) N}{0,1}$$

onde

$f(p)$ = fator de correção do consumo de permanganato a 50% , dependendo do valor de p mostrado na tabela do Apêndice I.

$f(t)$ = fator de correção da temperatura. Valores mostrados no Apêndice I.

W = peso em gramas da polpa seca

p = mililitros de KmnO_4 0,1 M consumidos pela polpa

b = mililitros de tiossulfato consumidos pelo branco

a = mililitros de tiossulfato consumidos no ensaio

N = normalidade do tiossulfato

c) Determinação da Viscosidade

Pesou-se exatamente 0,125g de polpa seca e colocou-se em um frasco pequeno com tampa, adicionando-se em seguida 25 mL de etilenodiamina cúprica, solução 0,5 M em cobre. A mistura foi agitada durante 10 minutos e transferida para um viscosímetro Fenske-Oswald, previamente aferido com óleo standard e utilizado dentro dos limites apropriados. O tempo de escoamento da solução foi cronometrado e o cálculo da viscosidade em centipoises (cp) foi determinado pela equação:

$$V = K.t.d$$

onde

K = constante da pipeta

t = tempo de escoamento em segundos

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

V = viscosidade da fibra de celulose em centipoises

d) 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 representados em porcentagem da alvura do óxido de magnésio (MgO), considerado igual a 100. A estabilidade da alvura foi

avaliada colocando-se a polpa em estufa a 100°C durante até 18 horas e medindo-se a alvura em seguida.

e) Cálculo da eficiência de deslignificação e seletividade:

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

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

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

4.5 Tratamento de Efluentes

Os efluentes gerados na sequência de branqueamento totalmente livre de cloro XAZQP depois de recolhidos e guardados em geladeira, foram submetidos à análise de cor, fenóis totais, lignina residual, açúcares redutores e toxicidade (MICROTOX).

O tratamento dos efluentes foi realizado incubado-se amostras de cada estágio com o fungo *Lentinus edodes*. O pré-inóculo do fungo foi feito em meio sólido contendo 1,25% de malte e 20% de efluente, durante 5 dias. Para produzir o inóculo em meio líquido, foram repicados 8 círculos do micélio crescido no meio sólido para 50 mL de meio líquido de

mesma composição. Depois de 5 dias de crescimento, o micélio foi filtrado e inoculado nas amostras dos efluentes, sem fonte adicional de carbono e sem esterilização, gerados no branqueamento XAZQP na razão de 2,5g de micélio seco/ 25 mL de efluente. As amostras foram incubadas a 30°C e 120 rpm durante 5 dias e para cada ensaio foi realizado um branco que consistiu na incubação das amostras sob as mesmas condições na ausência do fungo.

Ao final do tratamento aliquotas de cada efluente foram filtradas em membrana millipore 0,47µm e submetidas as mesmas análises anteriores.

4.5.1) Determinação da cor aparente

A cor é avaliada conforme descrito por ATLOW *et alii* (1983). 300 µL de efluente filtrado em membrana millipore são misturados com 600 µL de tampão fosfato pH 7,6. Em seguida lê-se a absorbância da solução em 465 nm, utilizando água para calibrar o espectrofotômetro.

4.5.2) Determinação de Fenóis Totais

A quantidade de fenóis é estimada colorimetricamente segundo método padrão APHA (1989) do reagente de Folim-Ciocalteu. O princípio do método é a reação entre o reagente de Folim-Ciocalteu, uma mistura de heteropoliácidos fosfomolibdênicos e fosfotúngsticos, e fenóis, com subsequente oxidação destes e formação de um complexo azul de molibdênio e tungstênio a uma taxa proporcional à concentração de fenóis.

Para 1 mL de efluente filtrado adiciona-se 250 µL de solução de carbonato-tartarato e 25µL de folim. A mistura reage durante 30 minutos a 20°C. Em seguida a absorbância da

solução é lida em 700 nm contra um branco contendo os mesmos reagentes com água no lugar do efluente. A curva de calibração é obtida a partir de diluições de uma solução estoque 10mg/L de fenol puro.

Solução carbonato-tartarato: 200g de carbonato de sódio foram dissolvidos em uma solução contendo 12g de tartarato de sódio em 750 mL de água destilada. A solução final é aquecida para total dissolução do carbonato e do tartarato. Após o esfriamento da solução completou-se o volume para 1L com água destilada.

4.5.3) Determinação de Lignina Residual

A metodologia para determinação da lignina residual segue procedimento de WAGNER *et alii* (1986). Aliquotas dos efluentes filtrados são diluídas apropriadamente com tampão fosfato pH 7,0 ou água destilada e a absorbância da solução é lida em 280 nm, utilizando o diluente para calibração do espectrofotômetro. A concentração de lignina é dada pela relação $c = a \cdot b / A$, onde A é absorbância da solução a 280 nm, a é a absortividade da lignina expressa por 20L/g cm e b é o caminho óptico de 1cm. O resultado final é então multiplicado pelo fator de diluição.

4.5.4) Determinação de açúcares redutores

Utilizou-se o método de reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico-DNS segundo MILLER (1959). Em 1,5 mL de efluente filtrado foram adicionados 3 mL de solução de DNS. A mistura foi incubada durante 5 minutos em banho de água fervente, esfriada em banho de gelo e a absorbância lida em 540 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Produção de Xilanases, β -Xilosidases e Celulases em Diferentes Fontes Polissacarídeas

Como destacado na introdução, o estudo de xilanases é de grande importância pela sua ampla aplicação industrial. No entanto, para viabilizar sua produção é preciso que as enzimas sejam produzidas em grande escala. Assim, a produção de xilanases deve-se basear em substratos lignocelulósicos que não representem custos elevados ao processo. Subprodutos da transformação agrícola, como por exemplo bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, são ricos em hemiceluloses e de baixo custo, sendo usados com sucesso na indução de xilanase em microorganismos (MILAGRES *et alii*,1993 ; KESKAR,1992 ; SAXONE *et alii*,1991). Segundo YANG & ERIKSSON (1992) preparações de hemicelulases com vistas à utilização em indústria de celulose e papel devem conter baixos níveis de endoglucanases para não diminuir a resistência física das polpas.

Baseando-se nestas informações procurou-se, no estudo da tabela 6., uma fonte de carbono que permitisse alta produção de xilanase e ausência de celulase. Dentre os materiais estudados a xilana comercial foi quem proporcionou os índices mais altos de produção de xilanase, com uma média 65 % superior ao farelo de trigo, segunda melhor fonte de carbono. As atividades de celulase e β -xilosidase foram determinadas apenas para as culturas crescidas em xilana comercial ou em farelo de trigo, pois a utilização de glicose e casca de arroz se mostrou ineficiente para produção de xilanases. Em ambos os casos verificou-se ausência de celulase e presença de pequenas quantidades de β -xilosidase. Decidiu-se, nos experimentos seguintes, utilizar a xilana comercial como fonte de carbono,

mas os resultados com farelo de trigo indicam ser esta uma fonte de carbono promissora e que ainda deve ser estudada e otimizada para futuras aplicações.

O aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura produziu um aumento significativo na atividade xilanolítica apenas quando utilizou-se xilana como fonte de carbono. Nos meios de cultura restantes a concentração de nitrogênio não afetou a produção da enzima, podendo concluir-se que o fator principal para indução de xilanases seja mesmo a fonte de carbono. Este resultado é concordante com proposta apresentada por BAILEY *et alii* (1993) de que apenas a fonte de carbono é um fator determinante para produção de xilanases por *Trichoderma reesei*. Nos ensaios seguintes optou-se por utilizar o meio de cultura convencional (3g/l de nitrogênio), já padronizado, a fim de possibilitar comparações com outros ensaios.

Tabela 6. Seleção de Fonte de Carbono para Indução de Xilanases.

MEIO DE CULTURA		ATIVIDADE ENZIMÁTICA *		
INDUTOR	NH ₄ / g L ⁻¹	Xilanase/ U mL ⁻¹	Celulase/ U mL ⁻¹	β-xilosidase/UL ⁻¹
C. ARROZ	1.0	4.4	-	-
GLICOSE	1.0	7.0	-	-
FARELO	1.0	36.0	0.03	7.1
XILANA	1.0	85.5	0.03	8.2
C. ARROZ	3.0	4.4	-	-
GLICOSE	3.0	9.6	-	-
FARELO	3.0	42.0	0.04	10.5
XILANA	3.0	107.3	0.02	26.4
C. ARROZ	5.0	3.2	-	-
GLICOSE	5.0	7.3	-	-
FARELO	5.0	39.0	0.03	10.5
XILANA	5.0	141.7	0.04	34.0

Aspergillus sp 2M1 foi incubado em meio sólido contendo a fonte de carbono indicada, a pH 6,0 e 30°C por um período de 120h

* desvio padrão das atividades enzimáticas variou de 1 a 3%

A baixa atividade de celulase permitiu o prosseguimento das atividades com este fungo nas sequências de branqueamento de polpa de celulose.

A atividade de xilosidase foi determinada porque estas enzimas atuam no sistema xilanolítico necessário para a degradação de xilanas e portanto podem ajudar no pré-branqueamento. Estas enzimas hidrolizam pequenos xilo-oligossacarídeos a partir do terminal não redutor, liberando xilopiranoses. Esta afinidade em degradar xilanas e xilooligossacarídeos é fundamental na conversão total da biomassa em monossacarídeos.

A tabela 7. mostra os resultados para atividade de xilanase em diversos meios indutores com xilana. Observou-se que o melhor indutor e substrato para determinação da enzima foi a xilana tipo birchwood comercial. A variação do substrato e do pH de diluição do extrato bruto foi realizada a fim de otimizar as melhores condições de determinação da enzima. Apesar de algumas diferenças na atividade enzimática a pH 6,0 e 5,3 optou-se por seguir a metodologia de BAILEY *et alii* (1992)(pH 5,3) que é um padrão internacional.

Tabela 7. Influência do Tipo de Xilana na Indução e Determinação de Xilanase.

INDUTOR	SUBSTRATO 1%	Tampão de Diluição	XILANASE/U _m L ⁻¹
Xilana birchwood	BIRCH	Fosfato pH 5,3	107.3
Xilana birchwood	BIR CH	Acetato pH 6,0	131.9
Xilana birchwood	BIRCH	Fosfato pH 8,0	81.8
Xilana birchwood	PINUS	Fosfato pH 6,0	74.5
Xilana de pinus	BIRCH	Fosfato pH 6,0	67.0
Xilana de pinus	PINUS	Fosfato pH 6,0	25.2
Xilana eucalipto	BIRCH	Acetato pH 5,3	80.8
Xilana eucalipto	EUCALIPTO	Acetato pH 5,3	81.7

Aspergillus sp 2M1 foi incubado em meio sólido a 30°C e pH 6,0 durante 120h.

* desvio padrão das atividades enzimáticas variou entre 1 e 3 %

A xilana extraída de eucalipto mostrou-se como uma boa alternativa ao uso de birchwood caso sua obtenção a nível comercial seja mais barata. A hemicelulose de pinus foi menos efetiva tanto na indução como na determinação de xilanase. Este fato pode estar relacionado à estrutura da xilana da madeira mole, arabino-4-O-Metilglucuranoxilana, que requer possivelmente a presença de arabinofuranosidase, feruloil esterase e cumaril esterase para ajudar na ação das outras enzimas xilanolíticas. A madeira dura (birch e eucalipto),

possui menor variabilidade dos substituintes e portanto apresenta maior facilidade em ser atacada pelas xilanases.

5.2) Condições para Crescimento de *Aspergillus sp* 2M1 e Produção de Xilanases

5.2.1) Efeito da Temperatura de Incubação no Crescimento e Produção de Xilanases por *Aspergillus sp* 2M1

Através dos resultados mostrados na tabela 8, pôde-se verificar que apesar deste microorganismo ter sido isolado em um ambiente natural de temperaturas mais amenas, seu crescimento e produção de xilanase atingiram um nível ótimo numa ampla faixa de temperatura (aproximadamente 28 a 34°C). Um aquecimento mais acentuado provocou queda em seu desenvolvimento, diminuindo sensivelmente a massa micelial e a atividade de xilanase (14 U/mL em 40°C). O fungo não cresceu quando a temperatura foi elevada a 50°C (fig. 9). Aparentemente a mais alta atividade da enzima coincidiu com o crescimento máximo do fungo, podendo-se dizer então que a produção de xilanases está associada ao crescimento celular. Resultados semelhantes já foram reportados para *Aureobasidium pullulans* (PRIEM *et alii*,1991) e para *Aspergillus awamori* (SMITH & WOOD, 1991).

Tabela 8. Efeito da temperatura de incubação.

Temp/ ° C	Xilanase / U mL ⁻¹
Ambiente*	107
34	111
40	14
50	0

O fungo foi cultivado em meio sólido, pH 6,0 durante 96h

* temperatura ambiente = 27-30°C

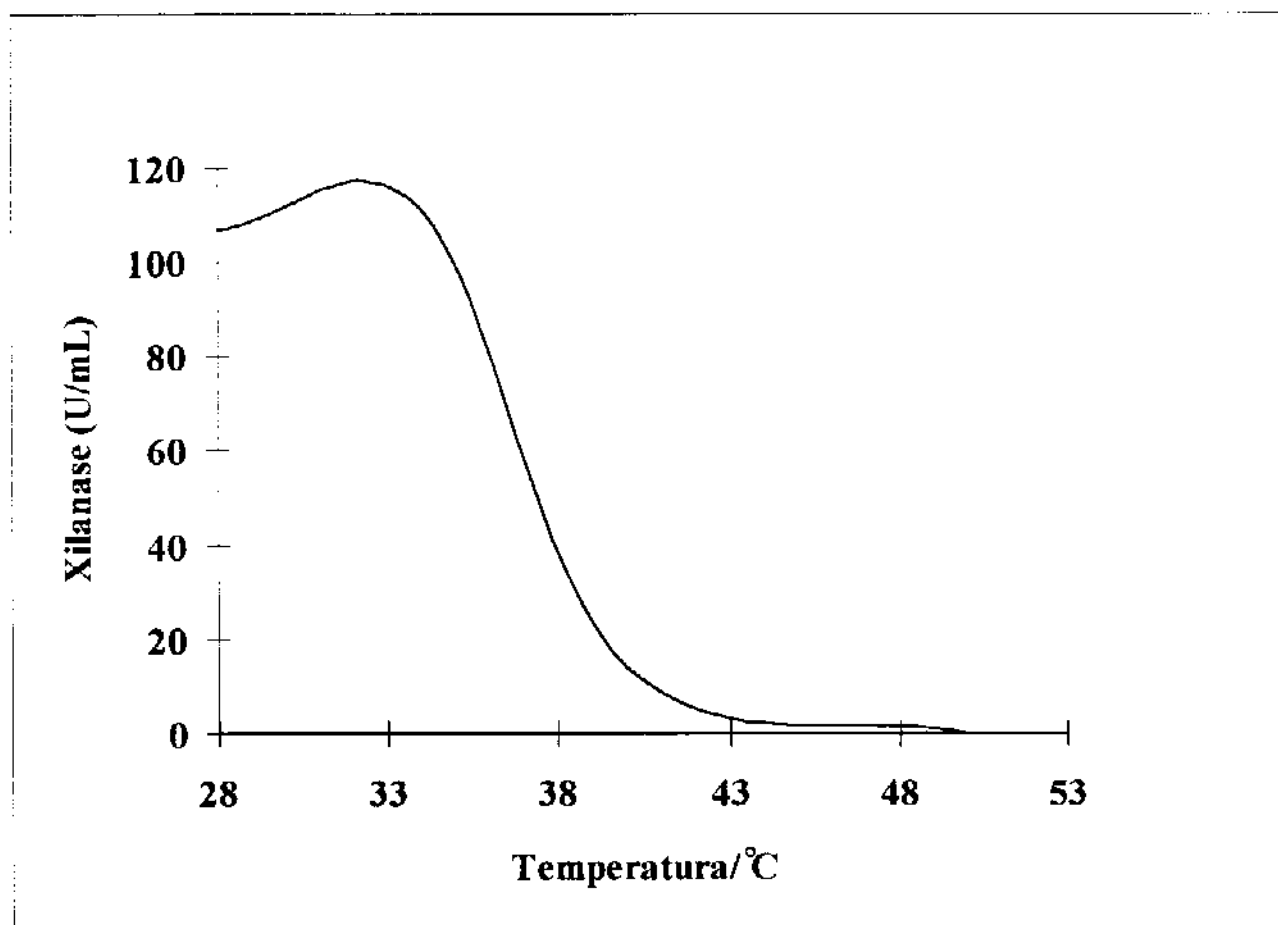


FIGURA 9. Variação da Atividade de Xilanase com a Temperatura de Incubação.

Aspergillus sp 2M1 foi inoculado em meio à base de xilana “birchwood” (Material e Métodos 4.2.5) e incubado por 96h nas temperaturas ambiente, 34, 40 e 50°C.

5.2.2) Influência do Estado Físico do Meio de Cultura e da Agitação na Produção de Xilanase

Tabela 9. Efeito da agitação e estado físico do meio de cultura.

Meio de Cultura	Agitação	Xilanase / U mL ⁻¹
Líquido	Estático	40,0
Líquido	150 rpm	74,0
Sólido	Estático	75,0

Aspergillus sp 2M1 foi cultivado em meios sólidos e líquidos contendo 1% de xilana “birch”, a 30°C e pH 6,0 durante 120h.

* desvio padrão das atividades enzimáticas estimados entre 0,5 e 2,5 %

Analisando a tabela 9. podemos concluir que em meios líquidos a agitação foi um fator importante para aumentar a quantidade de xilanases presentes no meio e que não há diferença entre a atividade média de xilanase quando do cultivo do fungo em meios sólidos ou líquidos com agitação.

Para culturas em meio líquido a agitação é a variável mecânica mais importante a ser controlada e o seu principal problema está na determinação dos níveis ótimos. Em alguns trabalhos foi observado que nem sempre em altas velocidades de agitação (alto teor de oxigênio em solução) obtiveram-se as melhores atividades enzimáticas (ROBINSON, 1984; RODRIGUEZ *et alii*, 1991). Conclui-se então, neste caso, que a agitação é importante mas ainda pode ser melhor otimizada quando o estudo envolver culturas líquidas.

De acordo com MITARD & RIBA (1988), o crescimento de fungos filamentosos em culturas líquidas segue um comportamento de fluidos não-newtonianos e o papel da agitação consiste em manter os filamentos bem dispersos a fim de evitar a formação de “pellets” metabolicamente inativos.

A comparação entre meio líquido e sólido foi realizada para verificar qual a eficácia que a extração realizada em culturas em placa proporciona, já que esta metodologia é bem mais simples e rápida para ensaios em laboratório do que a obtenção do extrato enzimático

por filtração do meio líquido. Como não houve diferença significativa entre as atividades de xilanase optou-se pela extração do meio sólido em todos ensaios.

5.2.3) Estudo da Cinética de Xilanase versus Protease

As proteases são enzimas normalmente excretadas no metabolismo primário de muitos microorganismos. Este metabolismo compreende o período dos três primeiros dias de crescimento, onde ocorre a formação do micélio. Essas enzimas hidrolisam proteínas e portanto podem influir na atividade enzimática de outras enzimas.

Durante estudos com ligninases observou-se uma queda significativa da atividade enzimática após 6-7 dias de incubação e uma possibilidade de explicação para tal fato seria a excreção de proteases durante o metabolismo secundário do fungo. Estudos com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foram realizados para elucidar o fato (DOSORETZ *et alii*, 1990a e 1990b.) e concluíram que na ausência de uma fonte de carbono de fácil metabolização o microorganismo excretava proteases e que o aumento destas enzimas afetava diretamente a atividade de ligninase, sendo responsável pelo seu decréscimo. A degradação de ligninases pelas proteases foi confirmada após tratamento da cultura do fungo com inibidores específicos para proteases, que resultou na recuperação da atividade enzimática de ligninase durante o metabolismo secundário. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado com o fungo *Chrysonilia sitophila* (resultados não publicados).

A figura 10. mostra a variação das atividades de xilanase e proteases excretadas pelo fungo *Aspergillus sp* 2M1 no período de 15 dias de incubação.

Foram observados dois máximos na atividade de protease, no segundo dia de incubação e no 7-8 dia de incubação. O primeiro máximo já era esperado, relacionado ao metabolismo primário, e o segundo poderia ser explicado como parte do metabolismo secundário, onde um microorganismo precisando de fonte de carbono e nitrogênio para se

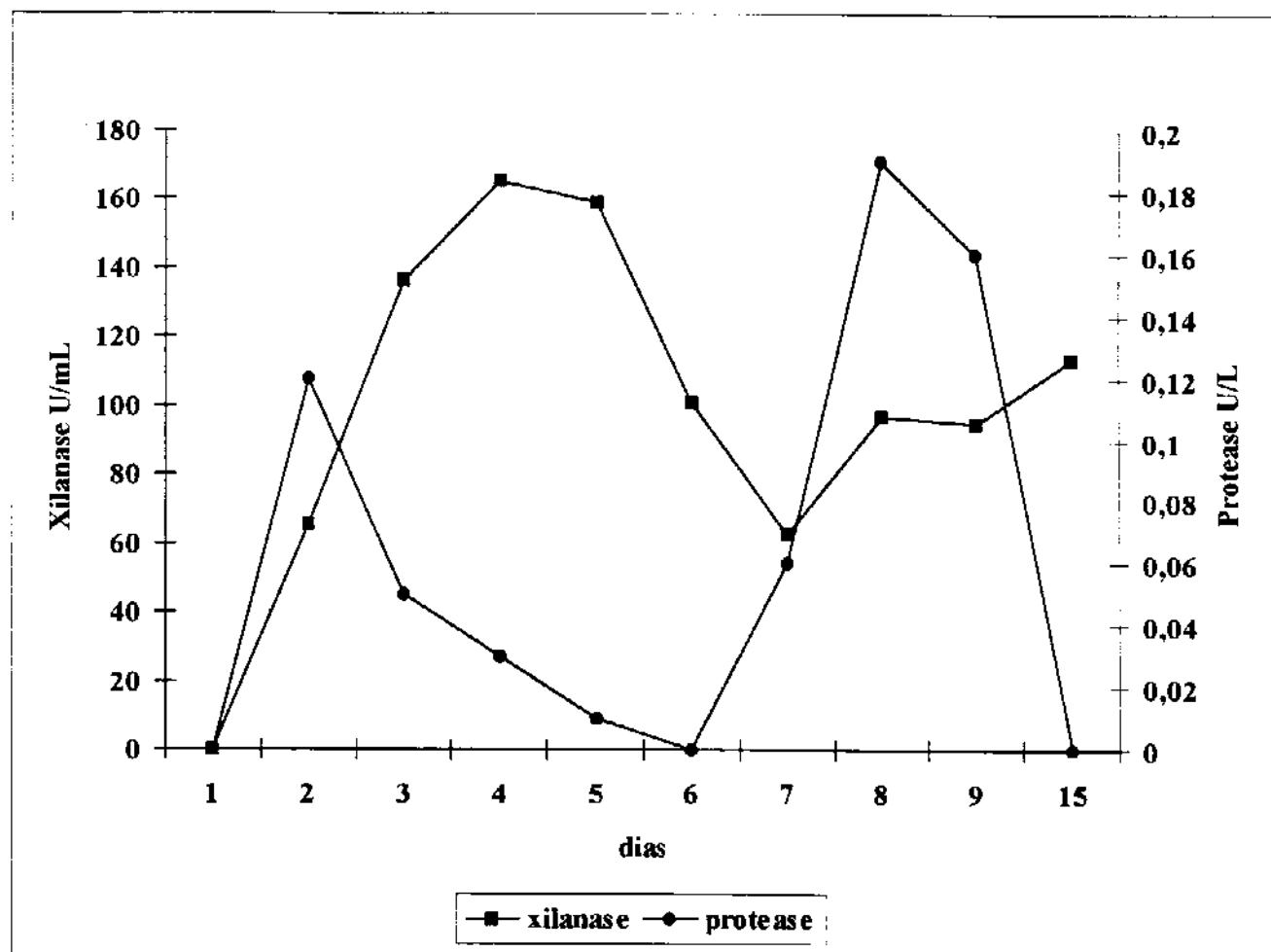


FIGURA 10. Cinética Xilanase x Protease

Aspergillus sp 2M1 foi cultivado em meio sólido contendo xilana tipo “birchwood” como fonte de carbono, a 30°C e pH 6,0. O extrato enzimático foi obtido dia a dia, durante 15 dias de cultivo, e as atividades de xilanase e protease foram determinadas.

manter pode excretar enzimas a fim de degradar carboidratos e proteínas.

O ponto mínimo na atividade de xilanase, atingido no sétimo dia, coincide com o começo da excreção de uma segunda protease no metabolismo secundário a partir do sexto dia. Ocorre porém que o aumento da atividade de protease não faz diminuir demasiadamente a atividade de xilanase, possivelmente devido ao fato de que a produção de xilanase é alta nesse período. Talvez na ausência de proteases a atividade de xilanase se mantivesse no mesmo nível atingido aos 5-6 dias ou até mesmo os superasse. No décimo quinto dia de incubação a atividade de xilanase foi de 113 U/mL e nenhuma atividade de protease foi determinada. Por precaução o fungo foi mantido em crescimento durante no máximo 5 dias nos ensaios subsequentes.

5.3) Propriedades do Extrato Enzimático Bruto.

O extrato enzimático bruto foi produzido a partir de culturas sólidas do fungo *Aspergillus sp* 2M1 que foram maceradas com uma solução tampão e filtradas. As xilanases presentes no extrato foram analisadas quanto ao pH ótimo, Temperatura ótima, estabilidade à temperatura e modificação do sítio ativo por inibidores específicos.

5.3.1) Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanase.

Tabela 10. Efeito da temperatura na atividade de xilanase.

XILANA	Atividade Máxima	T / °C
OAT	68,6 U/mL	55
BIRCH	143,0 U/mL	55
EUCALIPTO	88,4 U/mL	60

0,1 mL do extrato enzimático de *Aspergillus sp* 2M1, cultivado em xilana de eucalipto 1%, foi incubado durante 5 minutos a 30\40\50\55\60 e 70°C em 0,9 mL de Substrato "birch" 1% para determinação da atividade enzimática.

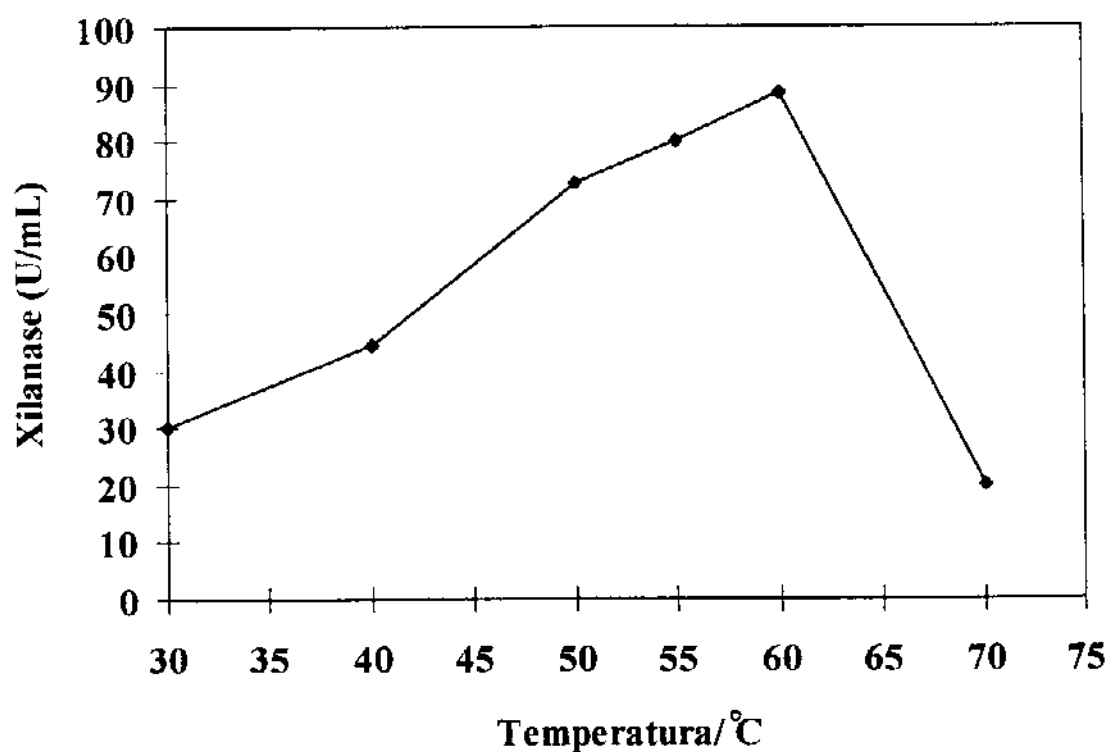


FIGURA 11. Efeito da Temperatura na Atividade de Xilanases de *Aspergillus* sp 2M1.

O extrato enzimático bruto do cultivo do fungo em meio contendo xilana extraída de eucalipto foi incubado às temperaturas de 30\40\50\55\ 60 e 70°C e a atividade enzimática de xilanase foi determinada utilizando substrato a base de xilana de “birchwood” comercial.

A figura 11. mostra o efeito da temperatura na atividade de xilanases de *Aspergillus sp* 2M1 cultivado em meio de cultura com xilana de eucalipto. Observou-se que a temperatura ótima para a sua atividade foi de 60°C. O resultado obtido foi comparado com outros resultados obtidos para xilana “birchwood” e xilana “oat”. Geralmente as xilanases ácidas possuem uma faixa de temperatura ótima de 50 a 60°C . Recentemente tem-se encontrado, principalmente em bactérias, xilanases com atividade máxima em temperaturas mais elevadas que podem chegar a 90°C (BEZALEL *et alii*, 1993; DAHLBERG *et alii*, 1993; RÄTTÖ *et alii*, 1994).

5.3.2) Efeito do pH na Atividade de Xilanase.

A tabela 11. e a figura 12. ilustram o efeito da variação do pH ótimo na atividade de xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.

Observou-se que o comportamento da enzima não se alterou com a mudança do tipo de madeira, guardando uma semelhança com os resultados obtidos no estudo da temperatura.

Normalmente as enzimas mantém a atividade numa ampla faixa de pH. No caso das xilanases de *Aspergillus sp* 2M1 a atividade foi mantida entre pH 4,5 a 6,0, com um ponto ótimo em 6,0. A maioria das xilanases fúngicas apresentam pH ótimo nesta faixa, mas já foram encontradas xilanases ácidas com pH ótimo em torno de 3,0 (FUNAGUMA *et alii*, 1991). Xilanases neutras ou básicas geralmente são produzidas por bactérias e têm sido reportadas com grande interesse, principalmente para aproveitamento na obtenção de celulose, que normalmente ocorre em meios muito alcalinos (DAHLBERG *et alii*, 1993; BEZALEL *et alii*, 1993; RÄTTÖ *et alii*, 1994).

Tabela 11. Efeito do pH na Atividade de Xilanase.

XILANA	Atividade Máxima	pH
OAT	57,3 U/mL	5,5
BIRCH	116,6 U/mL	5,5
EUCALIPTO	84,4 U/mL	6,0

Aliquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foram incubadas por 5 minutos a 50°C com 0,9 mL de substrato “birch” 1% em tampões de pH 4,0\5,0\5,5\6,0\7,0 e 8,0 e a atividade de xilanase determinada.

5.3.3) Estabilidade Térmica de Xilanases

Tabela 12. Meia- vidas para xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.

XILANA	SUBSTRATO 1%	T/ °C	t _{1/2}
PINUS	BIRCH	55	10,3 min
PINUS	PINUS	55	11,8 min
OAT	BIRCH	55	4,9 min
EUCALIPTO	BIRCH	55	10,1 min
EUCALIPTO	EUCALIPTO	55	9,2 min
BIRCH	BIRCH	55	13,4 min
OAT	BIRCH	40	9,4 h
PINUS	BIRCH	40	38,5 h
BIRCH	BIRCH	40	20,2 h
EUCALIPTO	BIRCH	40	13,9 h

Aliquotas do extrato enzimático bruto de *Aspergillus sp* 2M1, cultivado em meio sólido contendo xilanas de diferentes fontes, foram incubadas por tempos determinados a 55 e 40°C e em seguida a atividade de xilanase foi determinada normalmente, utilizando também xilanas de diferentes fontes como substrato.

Estudou-se a estabilidade térmica das xilanases de *Aspergillus sp* 2M1 a 55 e 40°C, utilizando xilanas de madeira dura (eucalipto e “birchwood”) e de madeira mole (pinus) como fonte de carbono indutora de enzimas. Os resultados foram comparados com outros

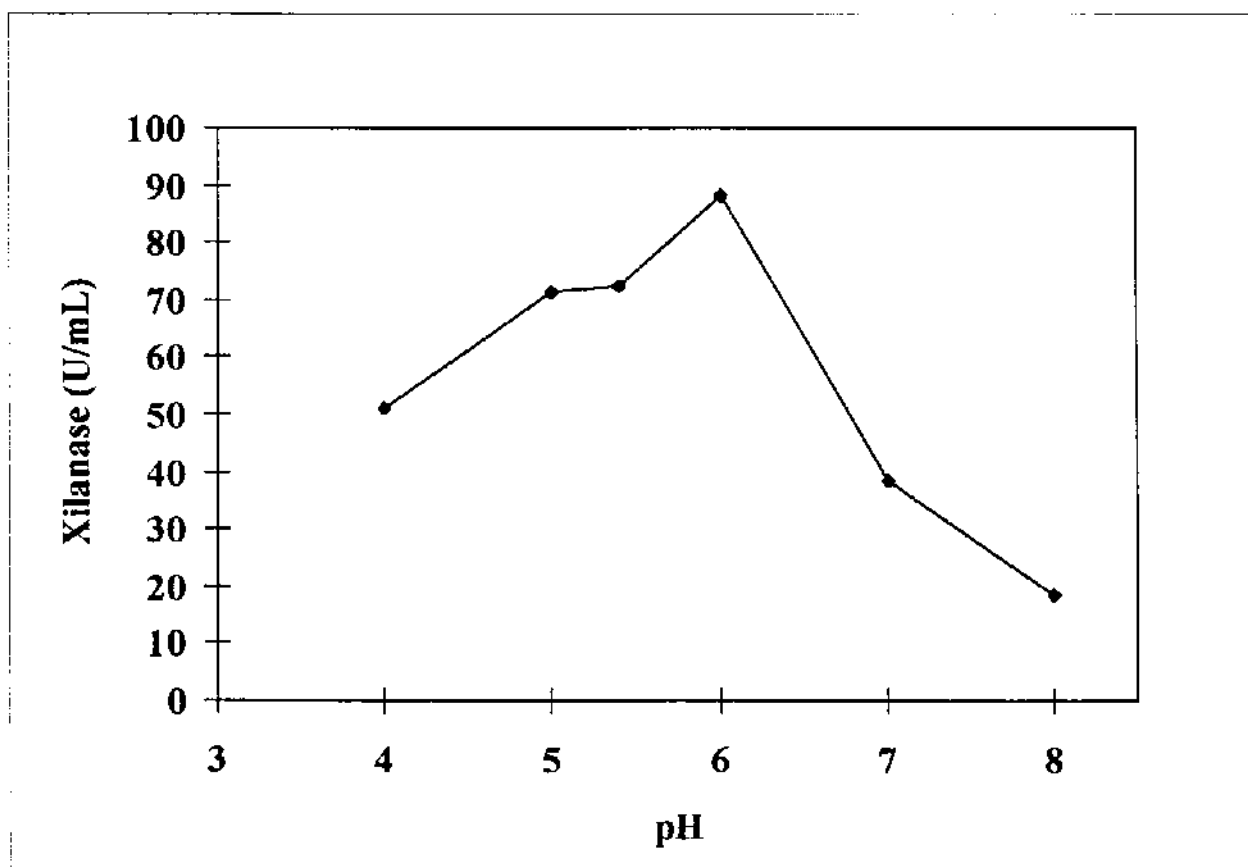


FIGURA 12. Efeito do pH na Atividade de Xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.

O extrato enzimático bruto, obtido do cultivo de *Aspergillus sp* 2M1 em meio contendo xilana extraída de eucalipto, foi incubado a 50°C com substrato de xilana tipo “birchwood” em solução tampão acetato de sódio (pH 4,0; 5,0 e 5,5) e em solução tampão fosfato (pH 6,0; 7,0 e 8,0). A atividade de xilanase foi determinada normalmente.

obtidos para indução utilizando xilana de aveia (“oat”-madeira mole) e podem ser vistos na tabela 12 e nas figuras 13,14 e 15.

À temperatura de 55°C pode-se dizer que todas as xilanases foram pouco estáveis, apresentando valores muito próximos que variaram aproximadamente de 9 a 13 minutos com exceção das xilanases induzidas por xilana tipo “oat”, menos estáveis ainda. Nos estudos efetuados com xilana de pinus e de eucalipto a xilana utilizada no substrato foi alterada, sendo substituída pela mesma xilana responsável pela indução das enzimas. Isto porque, sabe-se que substratos diferentes induzem diferentes tipos de xilanases, principalmente tratando-se de madeiras duras e moles. GOMES *et alii* (1993), em estudo realizado com o fungo *Thermomyces langinosus*, encontraram diferenças na termoestabilidade de xilanases quando estas foram induzidas em diferentes substratos lignocelulósicos. Neste caso porém, a estabilidade das enzimas a 55°C mostrou-se independente do substrato de indução ou determinação.

A 40°C a estabilidade das xilanases aumentou consideravelmente e apresentou diferenças com a mudança do tipo de xilana utilizado. No entanto, não houve nenhuma correlação entre valores mais altos obtidos e o tipo de xilana envolvido no ensaio.

A estabilidade da enzima a uma certa temperatura é um parâmetro muito importante a ser conhecido para sua aplicação correta no branqueamento ou pré-branqueamento de polpas de celulose ou qualquer outra aplicação industrial.

5.4) Modificação Química de Xilanases

Na tabela 13. podem ser vistos os resultados das atividades enzimáticas residuais quando o extrato enzimático bruto de xilanases de *Aspergillus sp 2M1* e a xilanase semi-purificada do mesmo fungo (cedida pelo laboratório de recursos naturais da Universidade de Concepción-Chile) foram tratados com inibidores de grupos funcionais específicos.

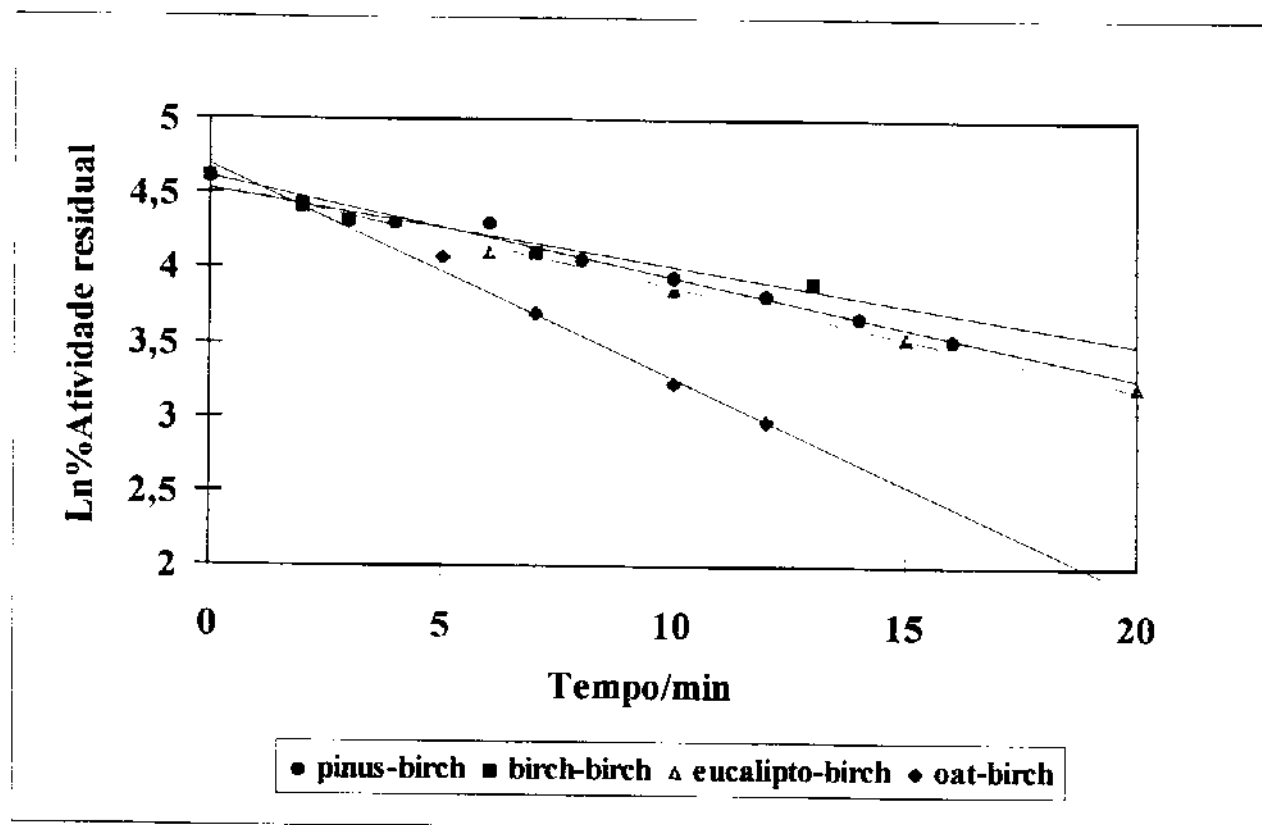


FIGURA 13. Estabilidade de Xilanases a 55°C.

Alíquotas do extrato enzimático bruto contendo xilanases induzidas por xilanas de pinus, “birchwood”, “oat” e eucalipto foram incubadas até no máximo 20 minutos a 55°C, sendo, em seguida, determinada a atividade de xilanase utilizando xilana tipo “birchwood” como substrato.

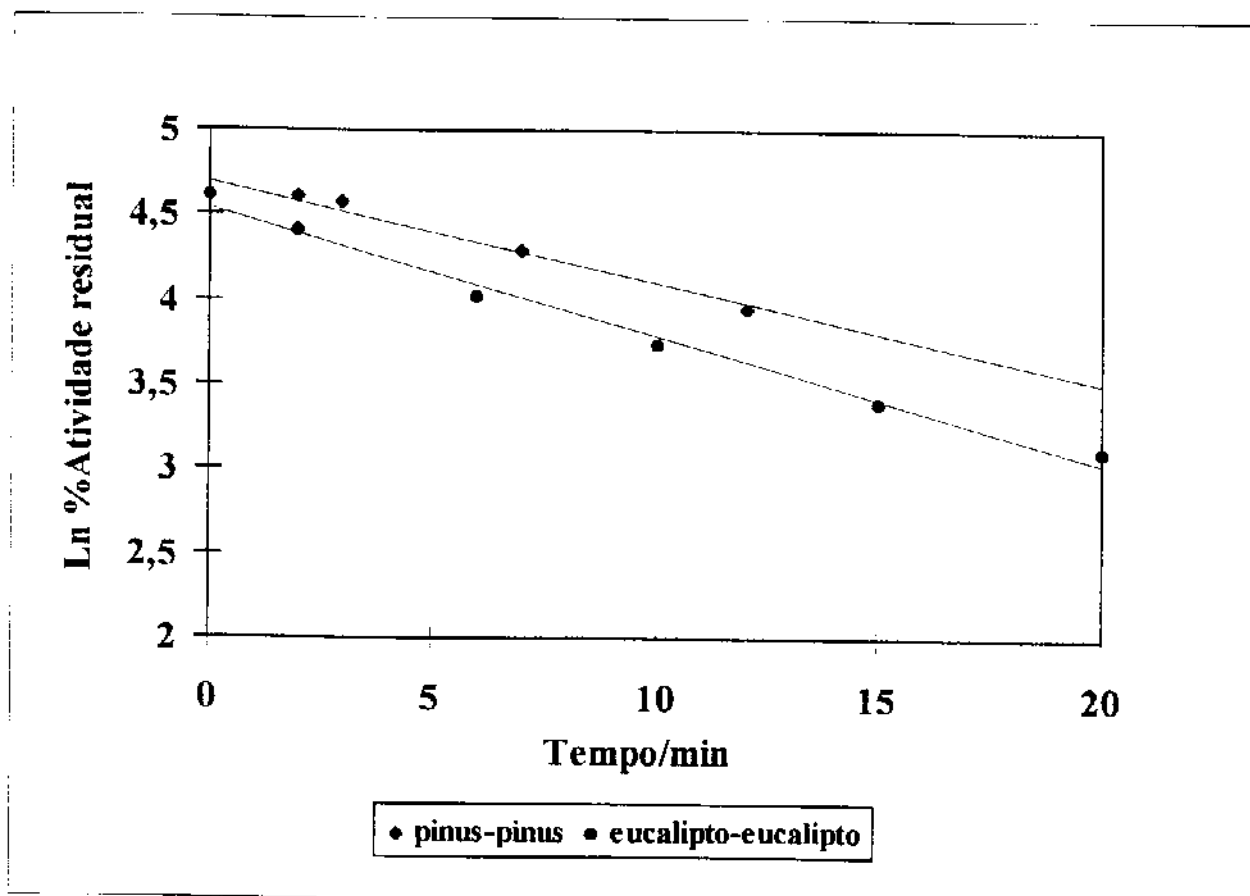


FIGURA 14. Efeito do Substrato na Estabilidade de Xilanases Induzidas por Xilanas de Pinus e Eucalipto

Aliquotas do extrato enzimático bruto contendo xilanases induzidas por xilana de pinus e eucalipto foram incubadas até no máximo 20 minutos a 55°C e a atividade de xilanase foi determinada em seguida utilizando, respectivamente, xilana de pinus e eucalipto como substratos para determinação da atividade enzimática.

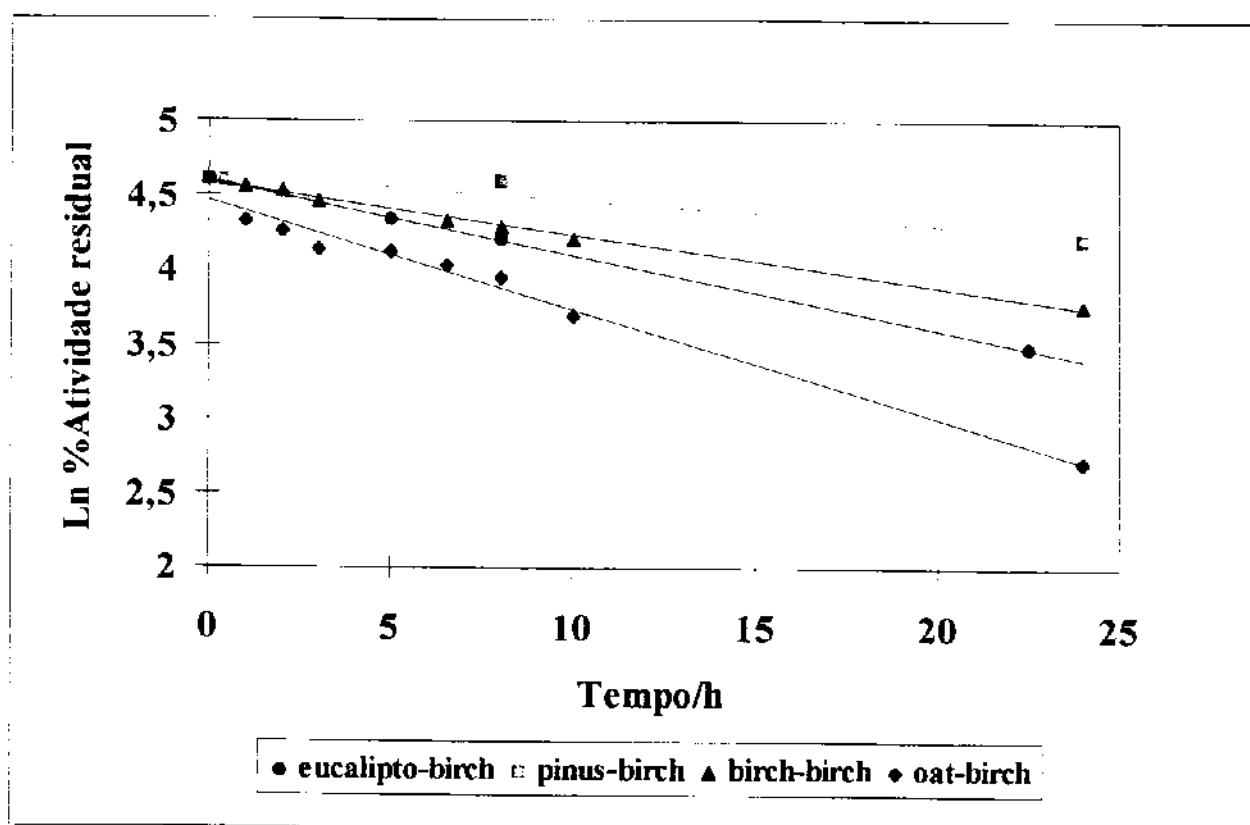


FIGURA 15. Estabilidade de Xilanases a 40°C.

Aliquotas do extrato enzimático bruto de xilanases induzidas por xilana de pinus e eucalipto foram incubadas por um período de até 24 horas a 40°C e a atividade enzimática de xilanase foi determinada em seguida utilizando xilana tipo “birchwood” comercial como substrato.

Tabela 13. Inativação de xilanases por reações com grupos do sítio ativo.

REAGENTE	ATIVIDADE RESIDUAL / %		Grupo Funcional
	Extrato Bruto	Enzima purificada	
EDC	29	15	CARBOXÍLICO
NBS - 0,1 mM	62	0	TRIPTOFANO
NBS - 0,5 mM	14	-	TRIPTOFANO
Azul de Metileno	99,7	100	IMIDAZOL
ODOACETATO	100	100	CISTEÍNA
2,3- Butanodiona	98	-	ARGININA
N-Acetilimidazol	100	100	FENOL
CLORAMINA - T	97,4	100	TIOETER

Aliquotas do extrato enzimático e de enzima purificada (0,4mg/mL) foram tratados com os reagentes especificados acima nas condições mostradas na tabela 2.

A carbodiimida reage com os grupos sulfidril da cisteína, com grupos hidroxila aromáticos da tirosina e com grupos carboxílicos em geral. No caso do EDC afetar a atividade enzimática poderia haver as três possibilidades. Para eliminar dúvidas de qual grupo está sendo atacado foi feita análise com os outros reagentes.

Devido a ausência de modificação dos resíduos de tirosina e cisteína com os tratamentos com N-Acetilimidazol e iodoacetato respectivamente, e combinando estes resultados com os encontrados para EDC, concluiu-se que estes dois amino ácidos não estão relacionados com a atividade enzimática. Já o NBS reduz drasticamente a atividade enzimática, mas não se pode concluir que seja devido somente à inibição do sítio ativo, porque ele também pode ocasionar a clivagem das ligações peptídicas da enzima. Para eliminar dúvidas seria indicado um tratamento com outro inibidor específico para grupos triptofano como HNBB (2-hidroxi-5-nitrobenzilbrometo).

Nota-se pelo quadro acima, que tanto o extrato enzimático bruto como o semi-purificado mostraram o mesmo comportamento frente aos reagentes, de onde pode-se concluir que realmente os grupos carboxílicos, presentes em resíduos de ácido glutâmico e aspártico, fazem parte do sítio ativo dessas xilanases. O resultado encontrado foi

concordante com outros colhidos para xilanases de *Streptomyces sp* (MARUI *et alii*, 1993).

O grau de inativação da xilanase foi investigado com EDC e os resultados podem ser vistos na figura 16. Através dos gráficos mostrados nesta figura puderam ser calculadas as constantes aparentes (K_{ap} = coeficiente angular das retas Log %Atividade residual x Tempo inativação). Assumindo, pelos dados colhidos, que a reação pode ser descrita como



Então, K_{ap} é igual a $K[\text{EDC}]^n$. Caso a reação seja de primeira ordem, o gráfico log-log dos K_{ap} x $[\text{EDC}]$ para cada concentração de EDC terá um coeficiente angular $n=1$.

Usando os resultados das constantes aparentes obtidos no ensaio com extrato bruto obtêve-se um $n=0,90$, e para os ensaios com a enzima semi-purificada o valor da ordem de reação encontrado foi de 0,93 (figura 17.). A tendência mostrada por estes resultados é de que as xilanases aqui estudadas apresentam uma cinética de primeira ordem, onde uma molécula de EDC reage com uma molécula de enzima quando a inativação ocorre. Este resultado foi muito similar ao apresentado por outras xilanases de *Streptomyces sp* (MARUI *et alii*, 1993).

Para conclusão do estudo do sítio ativo das xilanases de *Aspergillus sp* 2M1 o extrato bruto foi simultâneamente tratado com EDC 100mM na presença e ausência do substrato de xilanase, xilotriose, também na concentração de 100mM. Como pode-se observar na figura 18. a presença de xilotriose protegeu o sítio ativo da enzima da inativação proporcionada pelo EDC, e a enzima não perdeu atividade.

Este fato é de relevada importância, principalmente quando o objetivo a ser atingido é a possível aplicação da enzima no pré-branqueamento de polpas de celulose. A polpa carrega uma grande quantidade de hemicelulose, tanto na forma de polímero como em fragmentos, formando um ambiente natural de proteção da atividade de xilanase.

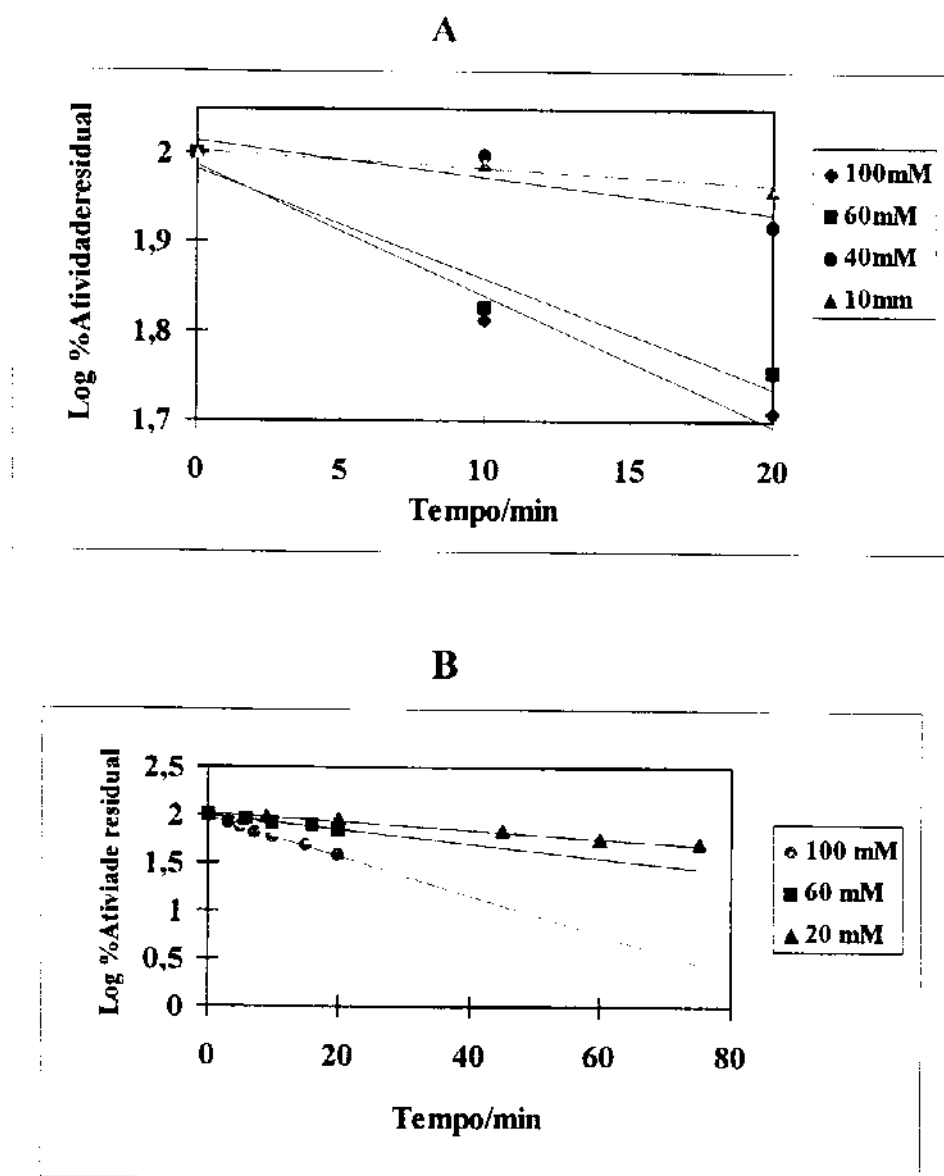


FIGURA 16. Cinética de Inibição de Xilanases por EDC

Aliquotas do extrato enzimático bruto e enzima purificada, na concentração final de 0,4 mg/ml, foram tratadas com EDC nas concentrações de 100, 60, 40 e 20 mM a 25°C, tampão acetato 0,1M pH 4,75 e 0,7M de NaCl durante tempos determinados, e em seguida amostras foram colhidas e diluídas apropriadamente em tampão acetato 50mM pH 5,3 e a atividade residual de xilanase foi determinada. A) Extrato Bruto B) Enzima Purificada.

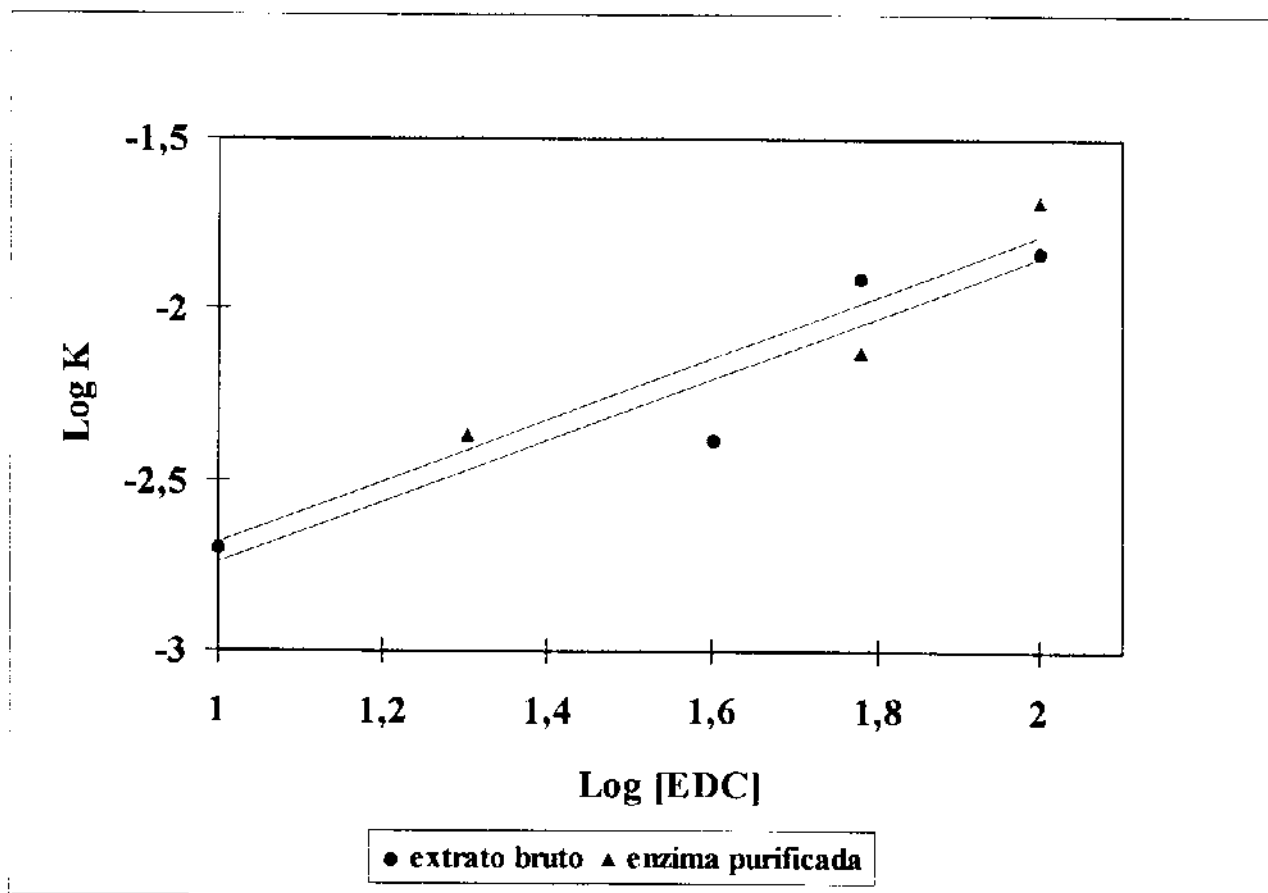


FIGURA 17. Determinação da Ordem da Reação - Relação entre K_{ap} e EDC

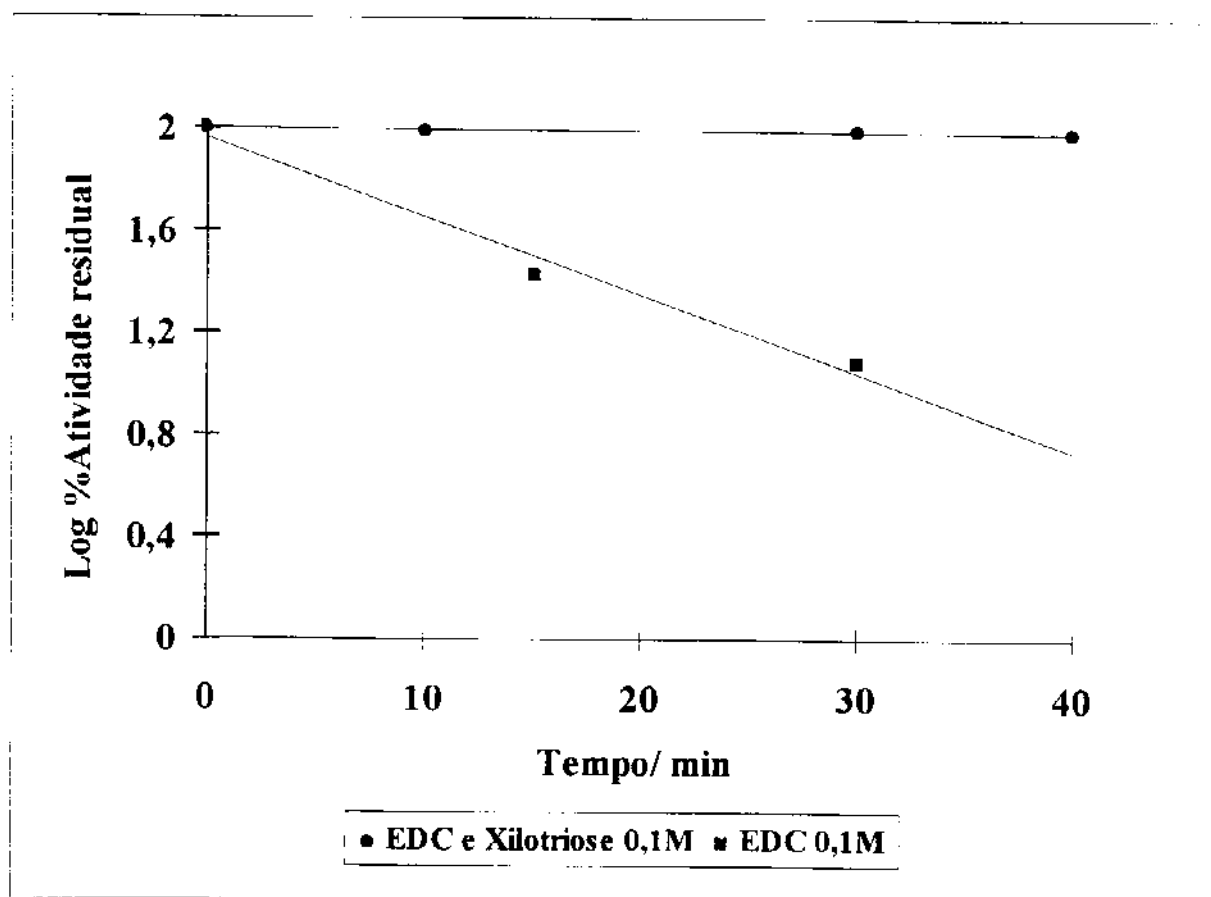


FIGURA 18. Proteção do Sítio Ativo por Xilotriose

Aliquotas do extrato enzimático bruto foram tratadas com EDC 0,1M, a 25°C em tampão acetato 0,1M, pH 4,75 e 0,7M de NaCl na presença e ausência de xilotriose 0,1M. A intervalos de tempo definidos, amostras foram colhidas, diluídas apropriadamente em tampão acetato 50mM pH 5,3 e a atividade residual de xilanase foi determinada.

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

5.5.1) Tratamento de Polpas Kraft com Xilanases Comerciais e de *Aspergillus sp* 2M1 (Asperzyme 2M1)

Inicialmente, antes da realização de qualquer ensaio, foram determinadas as atividades enzimáticas das xilanases utilizadas de modo que fossem aplicadas quantidades equivalentes de xilanase sobre as polpas (tabela 14). O valor da atividade de xilanase obtido de *Aspergillus sp* 2M1 corresponde ao extrato enzimático de cultivo, sem nenhuma etapa de purificação ou concentração.

As tabelas 15 e 16 mostram os resultados obtidos para viscosidade, número kappa e seletividade quando polpas kraft de eucalipto foram tratadas com xilanases na sequência de branqueamento XOP (Xilanase, Oxigênio e Peróxido de Hidrogênio). A xilanase Asperzyme apresentou características próximas às aquelas apresentadas pelas xilanases comerciais Cartazyme HS e Pulpzyme, com alguma superioridade em relação à última. Em relação ao ensaio controle, Asperzyme apresentou proteção da viscosidade e seletividade maior do que a obtida com utilização de Pulpzyme.

Tabela 14. Atividades Enzimáticas de Xilanases Comerciais.

ENZIMAS	pH	TEMPERATURA/°C	ATIVIDADE/ U mL ⁻¹
Asperzyme ^a	5,5	50	79
Cartazyme HS ^b	5,0	50	13160
Pulpzyme ^c	5,5	50	9400

a Xilanase obtida de *Aspergillus sp* 2M1 cultivado em 1% xilana “birchwood” comercial

b Xilanase comercial produzida pela Sandoz

c Xilanase comercial produzida pela NOVO

Tabela 15. Branqueamento de Polpas Kraft de Eucalipto com Xilanases (5 U/g) Utilizando a Sequência XOP.

ENSAIO	ETAPA - X		ETAPA - O		ETAPA - P	
	V / cp	Kappa	V /cp	Kappa	V /cp	Kappa
Controle	21,80	15,85	10,84	9,59	8,61	9,09
Asperzyme	21,95	14,31	11,86	9,43	9,24	8,69
Cartazyme HS	21,50	14,20	12,85	8,40	9,78	8,18
Pulpzyme	21,94	15,84	13,16	9,63	7,32	8,68

V = viscosidade da polpa em centipoises (cp) ; X = tratamento com xilanases ; O = tratamento com Oxigênio (1,7 Kgf/cm²) ; P = tratamento com peróxido de hidrogênio 1%. Referência - Número Kappa 18 e Viscosidade 25 cp.

Tabela 16. Seletividades do Processo XOP.

ENSAIO	SELETIVIDADE - X	SELETIVIDADE - O	SELETIVIDADE - P
Controle	0,93	0,83	0,73
Asperzyme	1,68	0,90	0,82
Cartazyme HS	1,44	1,10	0,90
Pulpzyme	0,98	0,98	0,73

Seletividade = $\frac{(\text{Kappa inicial} - \text{Kappa final})}{\text{Kappa inicial}} \times 100$
% redução da viscosidade

O tratamento da polpa com xilanases proporcionou um aumento na viscosidade final da fibra em relação ao controle, com exceção de Pulpzyme. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente (PAICE *et alii*, 1988; YANG *et alii*, 1993; DURÁN *et alii*, 1994). O aumento da viscosidade é atribuído à redução seletiva do conteúdo de xilanas das polpas. Como a xilana apresenta um menor grau de polimerização que a celulose a sua remoção aumentaria a viscosidade média da polpa. Pelo mesmo raciocínio o decréscimo na viscosidade provavelmente está relacionado à hidrólise da celulose, que pode ocorrer pelas condições mecânicas e reacionais do branqueamento ou estar associada à presença de endoglucanases nas preparações enzimáticas. Segundo YANG & ERIKSSON (1992) porém, o tratamento de polpas celulósicas com hemicelulases contendo pequenas

quantidades de endoglucanases aumentaria a permeabilidade das fibras sem entretanto afetar sua resistência física.

Pelas tabelas 15 e 16 verificou-se também que a xilanase Cartazyme HS foi a mais específica no branqueamento, com maior proteção da viscosidade final da polpa, maior redução do número Kappa e maior seletividade. Os resultados obtidos no tratamento da polpa com Asperzyme foram próximos aos apresentados pela Cartazyme e melhores do que os apresentados pela Pulpzyme.

5.5.2) Aplicação de Asperzyme 2M1 na Seqüência de Branqueamento XAZQP de Polpas Kraft de Eucalipto

Na tabela abaixo estão apresentados os valores de alvura, número Kappa e viscosidade obtidos no branqueamento de uma polpa kraft de eucalipto com uma seqüência totalmente livre de cloro, Xilanase-Oxigênio-Peróxido. As etapas de acidificação (A) e de tratamento com quelante (Q) são etapas de preparação da polpa para o tratamento com oxigênio (O) e peróxido (P) respectivamente, e por isso não aparecem no quadro.

Tabela 17. Parâmetros das Polpas Tratadas Com e Sem Asperzyme 2M1.

ENSAIO	Alvura / ISO %			Viscosidade / cps			Número Kappa			NCP
	X	Z	P	X	Z	P	X	Z	P*	
Asperzyme	54,3	82,0	89,7	24,0	7,7	7,6	7,82	1,76	1,2	0,73
Controle	53,4	81,3	89,6	24,2	9,9	6,9	8,00	1,77	1,4	0,69
Polpa Inicial	51,1	-	-	23,0	-	-	9,00	-	-	-

* valores extrapolados de Yang *et alii*, TAPPI J. 76, 91 (1993). NCP = valores tabelados, diretamente proporcionais à porcentagem de reversão da alvura.

No tratamento com Asperzyme 2M1 verificou-se o ganho de aproximadamente uma unidade ao final das etapas X e Z, em relação ao controle. Entretanto no estágio final foi obtido o mesmo valor para ambos os casos.

A viscosidade ao final do estágio XZ e Z diminui sensivelmente, devido principalmente a ação do ozônio. No final de todo o processo porém, o tratamento com Asperzyme protegeu a fibra, proporcionando um aumento de quase 2 unidades na viscosidade em relação ao controle. A estabilidade da alvura foi levemente maior sem enzima do que com o tratamento enzimático.

A seletividade da sequência de branqueamento controle ao final do tratamento com ozônio (sem enzima) mostrou-se maior do que a seletividade do mesmo processo utilizando Asperzyme. Ao final do tratamento com peróxido os valores se invertem, favorecendo o processo enzimático, devido à proteção da viscosidade proporcionada pela Asperzyme (tabela 18.) Os resultados obtidos foram comparados com outros apresentados pelo processo EnZone (YANG *et alii*, 1993), que utilizaram xilanases produzidas por *Aureobasidium pollulans*. Em ambos os processos a seletividade foi maior com o tratamento enzimático.

Tabela 18. Seletividade de Asperzyme 2M1 e EnZone.

ENSAIO	SELETIVIDADE - XZ	SELETIVIDADE - XZP
Asperzyme	1,20	1,30
Controle Asperzyme	1,40	1,20
EnZone ^a	-	1,22
Controle EnZone ^a	-	1,17

Seletividade = [(Kappa inicial - Kappa final / Kappa inicial) x 100] / % redução da viscosidade

a) Yang *et alii*. TAPPI J. 76,91 (1993).

Os resultados encontrados nas análises das propriedades físicas, mecânicas e ópticas da polpa de celulose tratada com e sem xilanase estão representados nas figuras 19, 20, 21 e 22.

O volume específico e a opacidade não mudaram significativamente após o tratamento com Asperzyme. Entretanto a alongação foi levemente melhorada quando comparada ao controle sem enzima. O gráfico de CSF (extrapolado dos valores Schopper-Reigler (°SR)) versus número de revoluções ou gramatura apresenta também uma superioridade da polpa tratada com enzima, ratificando que a proteção da viscosidade é uma propriedade importante de Asperzyme (fig. 19).

Tabela 19. Ensaios Físicos, Mecânicos e Óticos das polpas.

°SR	Nº Revol. ou Gramatura	Índice de Tração/N.mg ⁻¹	Enlong./mm	Índice de Estouro / Kpa.m ² g ⁻¹	Índice de Rasgo / mN.m ² g ⁻¹	Resistência ao ar / (s/100cm ³)
24	0.00 (0.00)	6.6 (41.6)	2.5 (2.5)	2.1 (1.8)	8.3 (9.3)	1.8 (1.5)
25	0.04 (0.15)	49.7 (56.0)	2.7 (3.1)	2.3 (2.7)	8.6 (10.7)	2.0 (2.6)
30	0.24 (0.41)	63.0 (66.6)	3.4 (3.7)	3.1 (3.6)	10.0 (11.4)	4.2 (7.6)
40	0.67 (1.00)	80.0 (80.7)	4.0 (4.2)	4.5 (4.8)	11.3 (11.5)	26.5 (46.7)
50	1.78 (2.55)	101.0 (98.6)	4.5 (4.6)	6.1 (6.3)	10.4 (9.4)	129.7(134.5)

Umidade relativa de 49% a 24°C ; Valores das polpas tratadas com Asperzyme em parênteses; CSF = Canadian Standard Freeness, HALWARD & SANCHES (1975).

O índice de rasgo foi melhor na polpa tratada com enzima do que no controle (fig.20). Este efeito não foi observado no caso da xilanase de *Aureobasidium pollulanas* (YANG *et alii*, 1993). Além disto, o índice de rasgo foi também melhor do que a polpa branqueada com a seqüência de branqueamento DEDED (Dióxido de cloro e Extração alcalina sucessivamente), polpa utilizada como referência no método EnZone.

A resistência ao ar, assim como o índice de estouro, foram superiores nas polpas tratadas com Asperzyme quando relacionados ao índice de rasgo (figuras 21 e 22). Conclui-se portanto, que mesmo não apresentando um ganho significativo na alvura final da polpa, o tratamento enzimático proporcionou um melhora na qualidade da fibra.

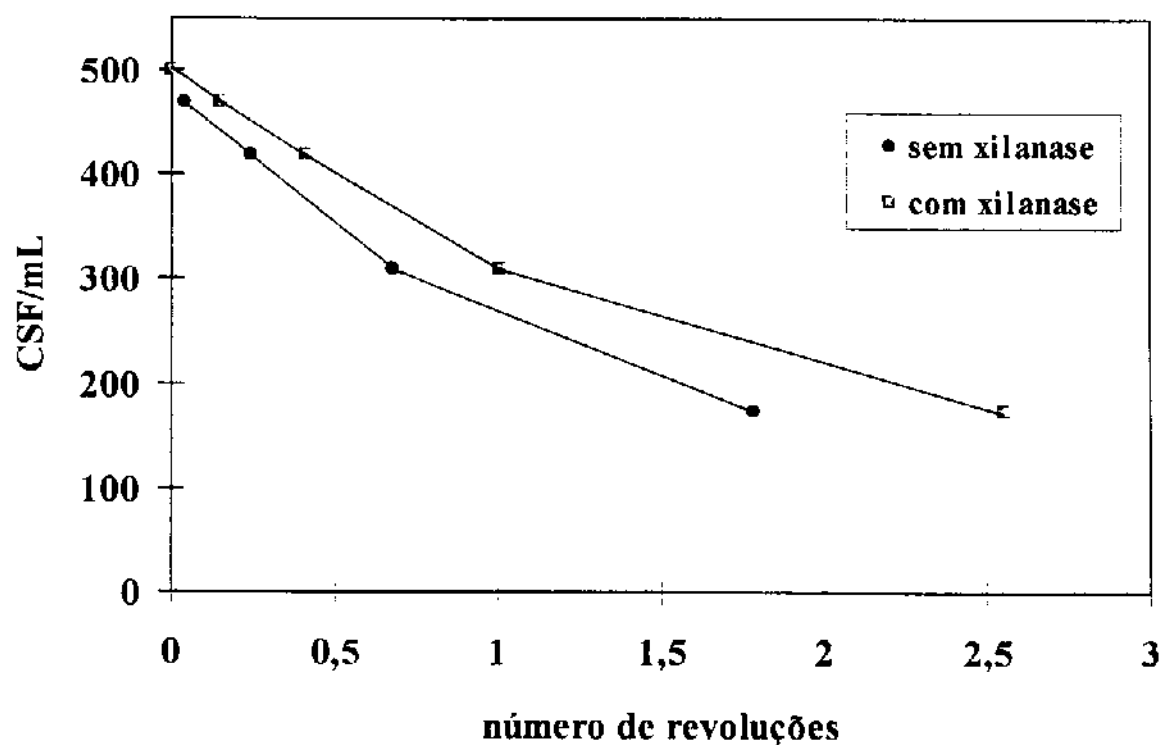


FIGURA 19. Efeito da Proteção da Viscosidade por Asperzyme nas Propriedades Físicas e Mecânicas das Polpas

Após a determinação da alvura, viscosidade e número kappa de polpas kraft de eucalipto tratadas com a sequência de branqueamento XAZQP foram medidas suas propriedades físicas, mecânicas e óticas.

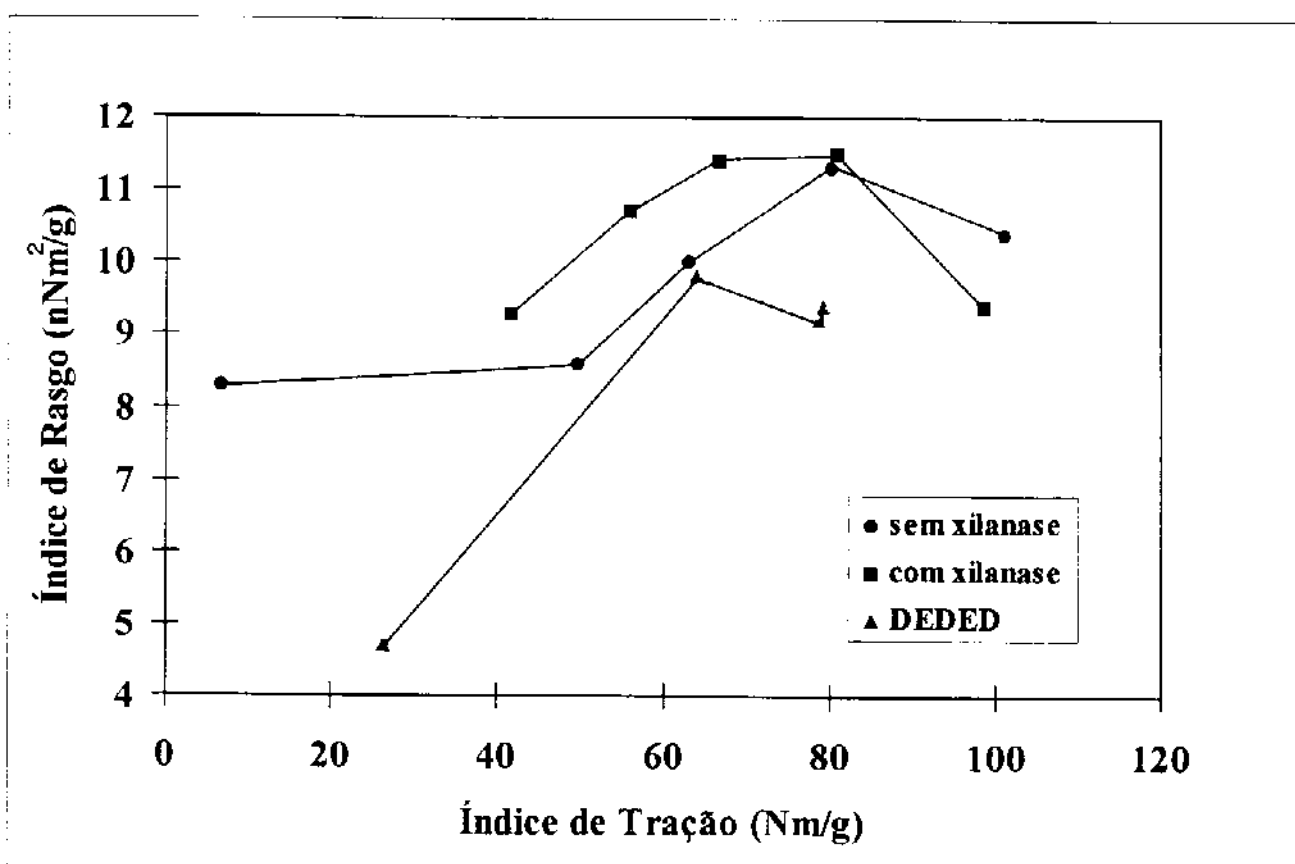


FIGURA 20. Comparação entre as Propriedades Mecânicas de fibras de Celulose Tratadas por Branqueamento Convencional (DEDED) e por Branqueamento Com e Sem Etapa Enzimática

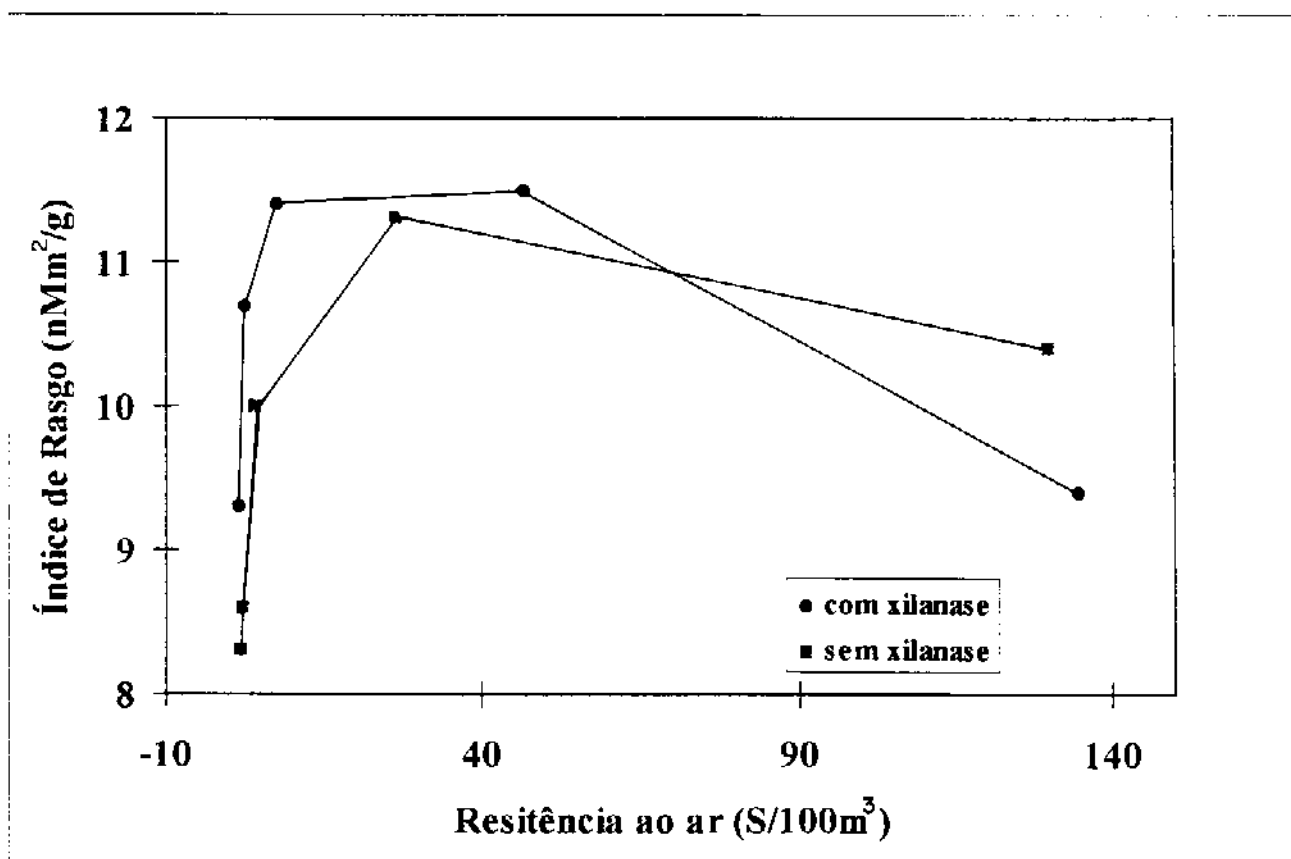


FIGURA 21. Comparação entre a Resistência Final das Polpas Obtidas pelos Processos AZQP (sem xilanase) e XAZQP (com xilanase)

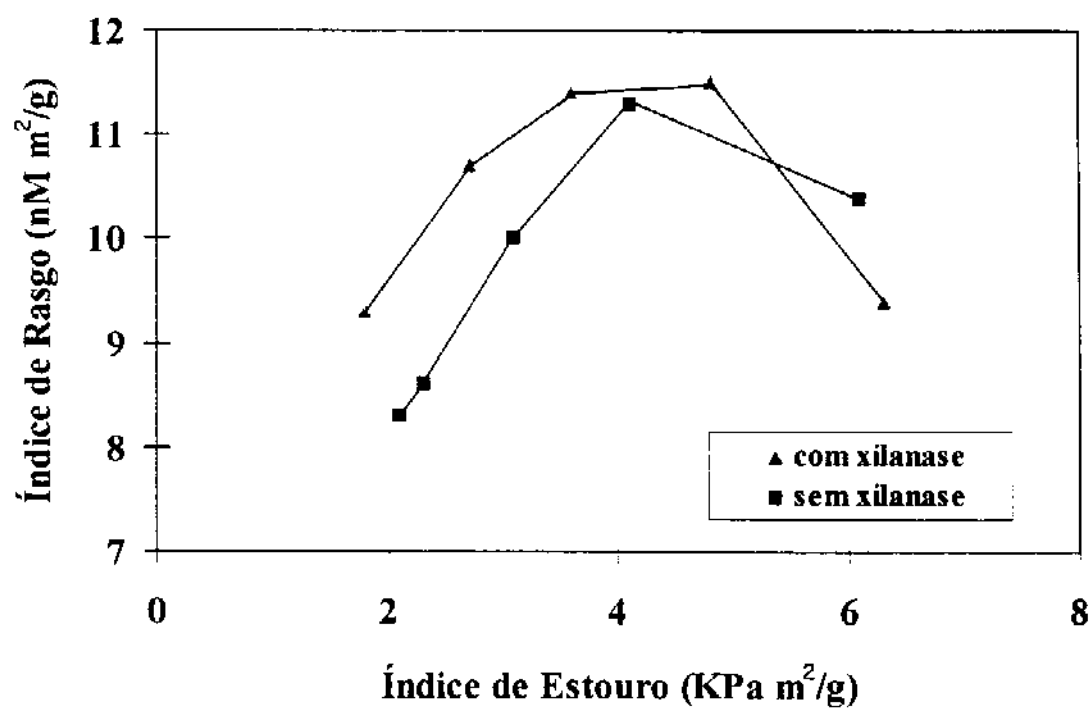


FIGURA 22. Relação entre o Índice de Estouro e de Rasgo para Polpas tratadas Com e Sem Xilanase

Cabe mencionar que, embora as condições reacionais do biobranqueamento com Asperzyme 2M1 ainda não tenham sido otimizadas, os resultados mostraram-se extremamente promissores. No futuro próximo pretende-se otimizar todo o processo a fim de obter-se uma alvura maior com menor perda de viscosidade e melhora das propriedades físico-mecânicas das polpas de *Eucalyptus*.

Recentemente também tem sido bastante estudada a aplicação de xilanases juntamente com outras enzimas, tanto hemicelulolíticas como ligninolíticas, no biobranqueamento de polpas de celulose. Segundo VIKARI *et alii* (1994), a aplicação de enzimas que hidrolisam cadeias laterais da xilana aumentam moderadamente a acessibilidade dos substratos às xilanases. Foi observado também, a formação de um produto intermediário solúvel de lignocelulose através da ação conjunta de xilanases, peroxidases e endoglucanases no cultivo de *Thermomonospora fusca* BD 25 em farelo de trigo (TRIGO & BALL, 1994).

5.6) Tratamento de Efluentes

Devido à importância que os processos de polpação e branqueio sejam cada dia menos poluentes, foram estudados os efluentes extraídos de cada estágio no branqueio AZQP sem e com tratamento com Asperzyme, para verificar sua toxicidade e sua tratabilidade.

A tabela 20. mostra as análises da cor, lignina solúveis, açúcares redutores e fenóis totais. Fundamentalmente, tanto na polpa controle (AZQP) quanto na polpa tratada com enzima (XAZQP) a cor está no lavado com tampão a pH 5,5 e no estágio pós-ozonização. Apesar do branqueamento da polpa ter sido mais eficiente durante o tratamento com ozônio em ambos os casos, o mesmo não aconteceu com a deslignificação, que foi maior na ozonização para as polpas AZQP, mas mais importante durante o tratamento enzimático para as polpas XAZQP.

Os açúcares redutores mostraram-se liberados em maior quantia após tratamento com Asperzyme. Tal fato é lógico devido à hidrólise das xilanas da polpa. Os fenóis totais seguem o mesmo padrão das ligninas solúveis.

Tabela 20. Análise dos Efluentes Originais na Sequência (-X)AZQP e XAZQP.

SEQUÊNCIA	COR (UC)	Lignina Solúvel (mg / L)	Açúcares Redutores (mg / mL)	Fenóis Totais (mg / L)
(-)X	249 (327)	45.8 (99.5)	0.089 (0.556)	3.15 (7.43)
A	23 (31)	3.0 (8.5)	0.052 (0.059)	0.19 (1.33)
Z	195 (109)	81.5 (72.5)	0.077 (0.089)	7.07 (5.88)
Q	156 (62)	90.5 (38.5)	0.263 (0.129)	9.65 (5.44)
P	31 (8)	29.3 (29.3)	0.059 (0.061)	1.71 (2.05)

X = sequência com Asperzyme (resultados entre parênteses) ; -X = sequência sem xilanase; Análise realizada dos efluentes sem nenhum tipo de tratamento, diretamente saídos do branqueamento.

Um aspecto importante no estudo de polpação TCF (totalmente livre de cloro) é a obtenção de processos não poluentes, logo é importante verificar a toxicidade destes efluentes. Através de análises feitas pelo método MICROTOX pôde-se observar que os efluentes obtidos são bastante tóxicos(Tabela 21.).

Tabela 21. Toxicidade (EC50) de Polpas TCF pelo Método MICROTOX.

ENSAIO	TOXICIDADE EC50 / %				
	(-)X	A	Z	Q	P
Controle - AZQP	100	93.5	26.9	100	5.0
Asperz. - XAZQP	25.8	29.3	31.3	100	11.0

Como visto, houve uma deslignificação significativa das polpas após o tratamento com Asperzyme, o que liberaria compostos fenólicos com certa toxicidade, o que não acontece

no controle. A conclusão vale também para para a etapa de acidificação. No estágio Z houve uma diminuição da toxicidade em torno de 5% após tratamento com a enzima e uma redução de 6% no estágio final.

Com o intuito de avaliar a tratabilidade destes efluentes, foi testado um fungo selecionado para tratamento de efluentes kraft de *Eucalyptus grandis*, *Lentinus edodes* UEC-2021. Embora este fungo não tenha sido adaptado para estes efluentes, os resultados mostraram-se muito promissores. Na tabela 22. podem ser vistos os valores de cor, lignina solúvel, açúcares redutores e fenóis totais após um tratamento de 5 dias dos efluentes gerados na sequência de branqueamento controle por *L. edodes* UEC-2021.

Tabela 22. Análise dos Efluentes da Sequência (-X)AZQP Após Tratamento com *L. edodes* UEC-2021.

SEQUÊNCIA	Redução da Cor (%)	Aumento Lignina Solúvel (mg/L)	Aumento Açúcares redutores (mg/mL)	Aumento Fenóis Totais (mg/L)
(-X)	56.3	23.3	0.017	3.06
A	25.0	39.3	0.000	4.40
Z	37.8	45.8	0.033	redução de 22%
Q	aumento da cor	0.0	redução de 35 %	redução de 30%
P	aumento da cor	120.5	0.021	6.58

O fungo atuou principalmente nas águas de lavado com tampão pH 5.5 , com cerca de 60 % de descoloração, liberação de ligninas e aumento de fenóis. No entanto, o microorganismo não degradou a lignina solúvel em nenhum dos efluentes. No estágio de ozonização houve uma menor redução da cor (40%) e aumento na liberação de ligninas solúveis. Somente neste efluente verificou-se consumo de açúcares redutores e os fenóis foram consumidos em cerca de 22%. Tanto no estágio de quelação como no de peroxidação houve aumento da cor, e liberação de ligninas solúveis e de fenóis.

Observou-se que nas polpas tratadas enzimaticamente o fungo atuou mais eficientemente, principalmente nos efluentes gerados pelo estágio X, apresentando 90% de

descoloração, diminuição de 7% das ligninas solúveis, 73% dos açúcares redutores e 5% dos fenóis (tabela 23.).

Tabela 23. Análise do Efluente da Sequência XAZQP Após Tratamento com *L. edodes* UEC-2021.

SEQUÊNCIA	Redução da Cor (%)	Aumento Lignina Solúvel (mg /L)	Aumento Açúcares Redutores (mg/mL)	Aumento Fenóis Totais (mg /L)
X	89.1	redução de 7%	redução de 73 %	redução de 5 %
A	aumento da cor	54.0	0.005	4.29
Z	aumento da cor	48.2	0.003	redução de 17%
Q	27.3	20.5	0.031	redução de 32%
P	aumento da cor	11.0	0.010	7.59

Ao final de todas as análises foram realizadas novas determinações da toxicidade, desta vez porém foram examinados somente os efluentes dos estágios que se mostraram mais tóxicos na análise inicial. Os resultados obtidos foram surpreendentes, com a eliminação completa de toda toxicidade apresentada pelos efluentes. Sabe-se que os fenóis são responsáveis pela toxicidade aguda dos efluentes, isto é, a toxicidade que eles possuem logo que são gerados. Também atribui-se a eles a toxicidade a longo prazo, mas os resultados aqui obtidos desmentem tal fato. Apesar da lignina solúvel e dos fenóis não terem sido consumidos pelo fungo a toxicidade dos efluentes foi eliminada pelo biotratamento, sugerindo que ela esteja ligada à carga orgânica total. Conclui-se portanto, que a diminuição da carga orgânica total deve ser hoje uma das principais metas no tratamento de efluentes.

Tabela 24. Toxicidade (EC50) dos Efluentes Após Biotratamento.

Toxicidade EC50 / %	ESTÁGIO - X	ESTÁGIO - Z	ESTÁGIO - P
Controle	(100) -	(26.9) 100	(5) 100
Asperzyme	(25.8) 100	(31.3) 100	(11) 100

Os valores entre parênteses correspondem aos EC50 dos efluentes sem tratamento.

6. CONCLUSÕES

1) Produção de xilanases

- As fontes de carbono xilana e farelo de trigo são adequadas para o cultivo de *Aspergillus sp* 2M1, permitindo crescimento micelial e desenvolvimento de atividade xilanásica.
- O farelo de trigo constitui uma alternativa promissora para produção de xilanases em larga escala.
- A ação de proteases excretadas no metabolismo secundário provoca uma queda na atividade de xilanase após o quinto dia de cultivo.
- Madeiras duras são mais eficientes na indução de xilanases.

2) Propriedades do extrato enzimático bruto

- As xilanases de *Aspergillus sp* 2M1 mantêm a atividade em ampla faixa de temperatura e pH.
- Na presença de substratos naturais as xilanases não perdem atividade por inibição através de modificação de grupos funcionais do sítio ativo.

- Um ou mais grupos carboxílicos fazem parte do sítio ativo de xilanases de *Aspergillus sp* 2M1.

3) Branqueamento de polpa kraft de eucalipto

- Asperzyme 2M1 atuou semelhantemente à xilanase comercial Cartazyme HS na seqüência de branqueamento totalmente livre de cloro XOP.

- Asperzyme 2M1 apresentou proteção da viscosidade final da fibra nas duas seqüências de branqueamento totalmente livre de cloro, XOP e XAZQP.

- As propriedades físico-mecânicas da polpa final obtida no processo XAZQP utilizando Asperzyme foram em média melhores que as obtidas nos processos AZQP e DEDED.

- A seqüência XAZQP com Asperzyme se mostrou mais seletiva do que as seqüências AZQP e XAZQP com xilanases de *Aureobasidium pollulanas*.

4) Tratamento de Efluentes

- Os efluentes gerados pelo branqueamento totalmente livre de cloro são bastante tóxicos à toxicidade medida por MICROTOX.

- A toxicidade é totalmente eliminada através de tratamento com fungo *Lentinus edodes* UEC-2021.

- A toxicidade dos efluentes também está ligada à carga orgânica total presente neles.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho procurou estudar as variáveis básicas que influenciam o crescimento, produção, atividade e aplicação de xilanases produzidas por *Aspergillus sp* 2M1. No entanto alguns estudos podem ainda ser realizados para complementá-lo, ficando como sugestões:

- 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 a fim de aumentar o rendimento e ampliar a escala do processo.

- Otimizar a produção de xilanase com uma fonte de carbono mais barata, como por exemplo farelo de trigo.

- Determinar as atividades de outras enzimas hemicelulolíticas tais como, arabinofuranosidase, glucuronidase, mananase e galactosidase, purificar e caracterizar as endo e exo xilanases para estudar o mecanismo de degradação de xilanas de madeiras duras e moles.

- Determinar os tipos de xilanases e as combinações com outras enzimas, como por exemplo, peroxidases e lacases, para serem utilizadas em seqüências de branqueamento de polpas de celulose.

8. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE

- Curotto,E., Aguirre,C., Concha,M., Nazal,A., Campos,V., Esposito,E., Angelo,R., Milagres, A.M.F., Durán,N. New Methodology for Fungal Screening: Xylanolytic Enzymes. Biotechnol. Techn. 7, 821 (1993).
- Curotto,E., Aguirre,C., Angelo,R., Esposito,E., Durán,N. Characterization and Production of Extracellular Xylanases from *Aspergillus sp* 2M1 Strain. Proc. Third Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Components 4, 7 (1994).
- Durán,N., Curotto,E., Esposito,E., Aguirre,C., Nazal, Angelo,R. *Aspergillus sp* 2M1 Xylanases: Production, Characterization and Application in the Pulp and Paper Industry. In Advances in Bioprocess Engineering (E. Galindo and O. Ramirez Eds.) Kluwer Acad. Publ. 489 (1994).
- Angelo,R., Aguirre,C., Curotto,E., Esposito,E., Milagres, A.M.F., Durán,N. Stability and Chemical Modification of Xylanase from *Aspergillus sp* (2M1 Strain). Biotechnol. Appl. Biochem. Submitted (1995).
- Esposito, E.; Curotto, E.; Aguirre, C.; Milagres, A.M.F.; Angelo, R.; Ruiz, J.; Durán, N. Strategy for Fungi Screening in the Pulp and Paper Industry: Chlorine Free Bleaching Process on Soft and Hardwood Pulp. Proc. 6th. Intern. Conf. on Biotechnology in Pulp and Paper Industry (K. Messner and E. Srbrotnik Eds.). Submitted (1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, R.W.; CLARCK, T.A.; WRATHALL, S.H. Pretreatment of radials pine kraft pulp with a thermophilicenzyme Part 2. Effect on oxygen, ozone and chlorine dioxide bleaching. APPITA, 47: 125-129, 1994.
- ALLISON, R.W.; CLARCK, T.A. Effect of enzyme pretreatment on ozone bleaching. TAPPI J., 77: 243-250, 1994.
- ANÔNIMO - No matter what you call it, chlorine-free bleaching is here to stay. Pulp and Paper Canada, 93 (5): 22 - 26, 1992.
- APHA. Standards methods for the examination of water and wastewater. 17 Ed. American Publ. Health Ass. N° 555 0B, p. 5.68, N.Y. , 1989.
- ATLOW, S.C; BONADONA-APARO,L.; KLIBANOV, A.M. Biotechnol. Bioeng., 26, 599-603, 1984.
- BAILEY, M.J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30: 5-10, 1989.
- BAILEY, M.J.; PULS,J.; POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases of *Aspergillus oryzae*. Biotechnol. Appl. Biochem., 13: 380-389, 1991.

- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol., 23 (3): 257-270, 1992.
- BAILEY, M.J.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan and cellulose - based media. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 224-229, 1993.
- BAJPAI, P.; BAJPAI, P. Biobleaching of kraft pulp. Process Biochem., 27: 319-325, 1992.
- BASTAWDE, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World. J. Microbiol. Biotechnol., 8: 353-368, 1992.
- BERENGER, J.F.; FRIXON, C.; BIGLIARDI, J.; CREUZET, N. Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercoarium*. Can. J. Microbiol., 31: 635-643, 1985.
- BERGBAUER, M.; EGGERT, C. Degradability of chlorine-free bleaching effluent lignins by two fungi: Effect on lignin subunits type and polymer molecular weight. Can. J. Microbiol., 40: 192-197, 1994.
- BEZALEL, L.; SHOHAM, Y.; ROSENBERG, E. Characterization and delignification activity of a thermostable α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 57-62, 1993.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol., 3: 286-90, 1985.

- BIELY, P.; MACKENZIE, C.R.; PULS, J.; SCHNEIDER, H. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. Bio/Technol., 4: 731-733, 1986.

- BISWAS, S.R.; JANA, S.C.; MISHA, A.K.; NANDA, G. Production, purification and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechnol. Bioeng., 35: 244-51, 1990.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-54, 1976.

- BRAY, M.R.; CLARKE, A.J. Essential carboxy groups in Xylanase A. Biochem. J., 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. Appl. Biochem. Biotechnol., 30: 9-15, 1991.

- BUCHERT, J.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; VIKARI, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pini kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 825-29, 1992.

- CARLBERG, G.E.; KRINGSTAD, A.; MATINSEN, K.; NASHAUG, O. Environmental impact of organochlorine compounds discharged from the pulp and paper industry. Papper ja Puu-Papper och Tra, 4: 336-41, 1987.

- CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Chem. Biol., 171: 501,1947.
- CHAUDARY, K.; TAURO, P. Selective induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei* by xylan. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15: 185-187, 1992.
- CHAUDRI, S.; THAKUR, I.S.; GOEL, R.; JOHRI, B.N. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Melanocarpus albomyces*. Biochem. Intern., 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: Int. Symp. Wood and Pulping Chemistry,2: 325-27, Paris,1987.
- CLAYESSENS, M.; LOONTIENS, F.G.; KESTERS-HILDERSON, H.; DE BRUYNE, C.K. Partial purification and propertiesof an *Aspergillus niger* β -D-xylosidase. Enzymol., 40: 177-88, 1970a.
- CLAYSSSENS, M.; KESTERS-HILDERSON, H.; VAN WAUWE, J.P.; DE BRUYNE, C.K. Purification of *Bacillus pumilus* β -D-xylosidase by affinity chromatography, FEBS Lett., 11: 336-338, 1970b.
- CLARCK, T.A.; STEWARD, D.; BRUCE, M.E.M.; McDONALD, A.G.; SIGH, A.P.; SENIOR, D.J. Improved bleachability of radiata pine kraft pulps following treatment with hemicellulolytic enzymes. APPITA, 44 (6): 389-404,1991.

- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4- D- xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol. Appl. Biochem., 17: 259-89,1993.

- CUROTTO, E.; AGUIRRE, C.; CONCHA, M.; NAZAL, A.; CAMPOS, V.; ESPOSITO, E.; ANGELO,R.; MILAGRES, A.M.F.; DURÁN, N. New methodology for fungal screening: xylanolytic enzymes. Biotechnol. Techn., 7 (11): 821-822,1993.

- DAHLBERG, L.; HOLST, O.; KRISTJANSSON, J.K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodotermus marinus* grown on xylan. Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 63-68, 1993.

- DEKKER, R.F.K.; RICHARDS, G.N. Hemicelulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carboh. Chem. Biochem., 32: 277-352, 1976.

- DEKKER, R.F.K. Bioconversion of hemicellulose : Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. Biotechnol. Bioeng., 25: 1127-1146, 1983.

- DEKKER, R.F.H. The enzymatic hydrolysis of biomass. IN:Seminário de Hidrólise enzimática de Biomassa, 2. Maringá , 1985.

- DESPHANDE, V.; LACHKE, A.; MISHA, C.; KESKAR, S.; RAO, M. Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa* . Biotechnol. Bioengineering, 28: 1832-1837,1986.

- DESPHANDE, V.; HINGE, J.; RAO, M. Chemical modification of xylanases; evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. Biochem. Biophys. Acta, 1041: 172-177, 1990.

- DOSORETZ, C.G.; CHEN, H.; GRETHLEIN, H.E. Effect of Environmental conditions on extracellular Protease activity in Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 395-400, 1990 a.

- DOSORETZ, C.G.; DASS, S.B.; REDDY, C.A. Protease-Mediated Degradation of Lignin Peroxidase in Liquid Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 3429-3434, 1990 b.

- DURÁN, N.; CUROTTO, E.; ESPOSITO, E.; AGUIRRE, C.; NAZAL, A.; ANGELO, R. *Aspergillus* sp 2M1 xylanases: production, characterization and application in the pulp and paper industry. In Advances in Bioprocess Engineering (E. Galindo and O. T. Ramirez Eds.) Kluwer Acad. Publ. 489, 1994

- ESTEBAN, R.; CHORDI, A.; VILLA, T.G. Some aspects of 1,4- β -D-xylanase and β -D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26. FEMS Microbiol. Lett. 17: 163-166, 1983.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions., Walter de Gruyter, N.Y., USA, 1984.

- 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. Biotechnol. Bioeng., 27: 525-532, 1985.

- FUJITA, K.; KONDO, R.; SAKAI, K.; KASHINO, Y.; TAKAHARA, Y. Biobleaching of kraft pulp using white-rot fungus IZU-154. TAPPI J., 74: 123-127, 1991.
- FUNAGUMA, T.; NAITO, S.; MORITA, M.; OKUMURA, M.; SUGIURA, M.; HARA, A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Barnier and Sartory. Agric. Biol. Chem., 55: 1163-1165, 1991.
- GANDHI, J.; ROO, K.K.; DOVE, P.J. Characterization of extracellular thermostable xylanase from *Chloclonium glosobum*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 60: 55-60, 1994.
- GILBERT, M.; BREUIL, C.; YAGUCHI, M.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255. Appl. Biochem. Biotechnol., 34/35: 247-259, 1992.
- GOMES, J.; PURKARTHOFFER, H.; HAYN, M.; KAPPLMÜLLER, J.; SINNER, M.; STEINER, W. Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces langinosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39: 700-707, 1993.
- GUSEK, T.W.; JOHNSON, R.D.; TYN, M.T.; KINSELLA, J.E. Effect of agitation shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. Biotechnol. Bioeng., 37: 371-374, 1991.
- HARADA, H.; COTÉ, J.R. Structure of Wood. In : Takayoshi H. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, 679, 1985.

- HELMLING, O.; SUESS, H.U.; MEIER, J.; BERGER, M. Mill experience with oxygen and hydrogen peroxide bleaching stages. TAPPI J., 71: 55-61, 1989.
- HOG, M.M.; HEMPEL, C.; DECKWER, W.D. Cellulose-free xylanase by *Thermomyces langinosus* RT₉: Effect of agitation, aeration and medium components on production. J. Biotechnol. 37: 49-58, 1994.
- HON, N.S.; SHIRAISHI, N. Wood and cellulosic Chemistry. Marcel Dekker, Inc. N.Y., 1991.
- HOLTRICH, D.; STEINER, W. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*: effect of medium components. Enzyme Microbiol. Technol., 16: 229-235, 1994.
- HORTLING, B.; KORHONEN, M.; BUCHERT, J.; SUNDQUIST, J.; VIIKARI, L. The leachability of lignin from kraft pulps after xylanase treatment. Holzforschung, 48: 441-446, 1994.
- HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANSKA, M. Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. Arch. Microbiol., 144: 307-311, 1986.
- JANES, R.L. The Chemistry of Wood and Fibres. IN: McDONALD, R.G.; FRANKLIN, J.N. The pulping of wood. New York, McGraw Hill, 1969.
- JANSHEKAR, H.; FIETCHER, A. Lignin: biosynthesis, application and biodegradation. Adv. Biochem. Eng/Biotechnol., 27: 119-178, 1983.

- JOHN, M.; SCHMIDT, B.; SCHMIDT, J. Purification and some properties of five endo-1,4- β -D-xylanases and β -xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Can. J. Biochem., 57: 125-134, 1979.

- JOHN, M.; SCHMIDT, J. Xylanase and β -xylosidase of *Trichoderma*. Methods Enzymol., 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 Microb. Technol., 10: 403-409, 1988.

- JOHNSON, A.P. Fitting together the ECF-TCF jigsaw. APPITA, 47: 243-251, 1994.

- KANTELINEN, A. Enzymes in bleaching of kraft pulp. PhD Thesis. Espoo, Finland, Helsinki University of Technology, 1992.

- KANTELINEN, A.; HORTLING, B.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M.; VIKARI, L. Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. Holzforschung, 47, 318-324, 1994.

- KARNI, M.; DEOPURKAR, R.L.; RALE, V.B. β -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues. World J. Microbiol. Biotechnol., 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-xylanopyranosyl-(1,4)-D-xylanopyranose as a component of *Zea* shoot cell-walls. Carbohydrate Res. , 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. Biochem. J., 261: 49-55, 1989.

- KESKAR, S.S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7: Cultural conditions and enzyme properties. Biotechnol. Lett. 14 (6) : 481-86,1992.

- KHANDKE, K.M.; VITHAYATHIL, P.J.; MURTHY, S.K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Arch. Biochem. Biophys., 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. Appl. Environ. Microbiol., 59(6): 1725-1730, 1993.

- KIRK, T.K.; YANG, H.H. Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. Biotechnol Lett., 1(9): 347-352, 1979.

- KIRKPATRICK, N.; REID, I.D.; ZIOMEK, E.; PAICE, M.G. Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33: 105-108, 1990.

- KLUEPFEL, D.; DAIGNEAULT, N.; MOROSOLI, R.; SHARECK, F. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces levidans* 66. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36: 626-631, 1992.

- KOPONEN, R. Enzyme systems prove their potential. Pulp Paper Intern.: 20-25, 1990.

- KROGERUS, M.; HYNINEN, P. Emission treatment options and cost in the pulp and paper industry. Proc. Intern. Environm. Symp. EUCEPA-(93), 1: 87-95, 1993.

- LAPPALAINEN, A. Purification and characterization of xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Appl. Biochem., 8: 437-448, 1986.

- LACHKE, A.H.; DESPHANDE, M.V. *Sclerotium rolfsii*: status in cellulase research. FEMS Microbiol. Rev., 54: 177-194, 1988.

- LESCOT, J.-G.; JAPPINEN, J. Effluent treatment in pulp and paper mills: Present technology and development trends. APPITA, 47: 330-335, 1994.

- 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*. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2831-2834, 1987.

- MACKENZIE, C.R.; ; BILOUS, D.; SCHNEIDER, H.; JOHNSON, K.G. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces spp.* Appl. Environ. Microbiol., 53: 2835-2839, 1987.

- MACLEOD, M. Chlorine-free bleaching; ozone and enzymes to the rescue? TAPPI J., 204-208, 1991.

- MAGEE, R.J.; KOSARIC, N. Bioconversion of Hemicellulosics. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 32: 61-93, 1985.

- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurements of saccharifying cellulase. J. Bacteriol., 73: 269-78, 1976.

- MARUI, M.; NAKANISHI, K.; YASUI, T. Chemical Modifications of Xylanases from *Streptomyces* sp. Biosc. Biotechnol. Biochem. 57(4) , 662-663, 1993.

- MILAGRES, A.M.F.; LACIS, L.S. Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentation. Biotechnol. Lett., 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 Microb. Technol., 15; 248-253, 1993.

- MILAGRES, A.M.F.; PRADE, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and it's use in the recercy of cellulosic textile fibers. Enzyme Microbiol. Technol. 16: 627-632, 1994.

- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-28, 1959.

- MITARD, A.; RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. Biotechnol. Bioeng., 32: 835-840, 1988.

- MISHRA, C.; FORRESTIER, 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. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33: 226-232, 1990.

- MOUNTEER, A.H.; COLODETTE, J.L.; GOMIDE, J.L; CAMPOS, A.S. Alternativas para o branqueamento sem cloro molecular. O Papel, 25-35, 1992.

- MURTY, M.V.S.; CHANDRA, T.S. Expression of xylanase and cellulase enzymes in a newly isolation *Clostridium* sp SAIV. Enzyme Microb. Technol., 13: 430-35,1991.

- 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 Physiol., 87: 883-89, 1988.

- NISHITANI, K.; NEVINS, D.J. Glucuranoxylan xylanohydrolased. A unique xylanase with the requirements for appendant glucuranosyl units. J. Biol. Chem, 266: 6539-6543, 1991.

- OKEKE, B.C.; PATERSON, A. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in *Streptomyces* sp. World J. Microbiol. Biotechnol., 483-487, 1992.

- OKEKE, B.C.; OBI, S.K.C. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an Arthrographis species. World J. Microbiol. Biotechnol., 9: 345-349, 1993.

- ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps : A review. Biotechnol. Adv., 11: 179-198, 1993.

- OSHIMA, M. Wood Chemistry Process Engineering Aspects USA - Noyes Development Corporation, p. 157, 1965.

- PAICE, M.G.; JURASEK, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. J. Wood Chem. Technol., 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. Biotechnol. Bioeng., 32: 235-239, 1988.

- PAICE, M.G.; GURNAGUL, N.; PAGE, D.H.; JURASEK, L. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. Enzyme Microb. Technol., 14(4): 272-276, 1992.

- PATEL, N.; GRABSKI, A.C.; JEFFRIES, T.W. Chromophore release from kraft pulp purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39: 405-412, 1993.

- PECK, V.; DOLEY, R. Toward a "greener" pulp and paper industry. The search for mill effluent contaminants and pollution prevention technology. Environ. Sci. Technol., 28: 524-527, 1994.

- PIÑAGA, F.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; VALLE'S, S.; RAMON, D. Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression. FEMS Microbiol. Lett., 115: 319-324, 1994.

- POUTANEN, K.; RÄTTÖ, M.; PULS, J.; VIKARI, L. Evaluation of two different microbial xylanolytic systems. J. Biotechnol., 6: 49-60, 1987.
- POUTANEN, K. & PULS, J. Characterization of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28: 425-432, 1988.
- POUTANEN, K.; SUNBERG, M. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28: 419-424, 1988.
- POUTANEN, K.; K.; SUNBERG, M.; KORTE, H.; PULS, J. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33: 506-510, 1990.
- PRIEM, B.; DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C.-C. Production of 1,4- β -xylanase in continuous culture by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. Biotechnol. Lett., 13(3): 149-154, 1991.
- PULS, J.; SCHMIDT, O.; GRANZOW, C. α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. Enzyme Microb. Technol., 9: 83-88, 1987.
- RAGOUSKAS, A.J.; POLL, K.M.; CESTERNINO, A.J. Effect of xylanase pretreatment procedure on non-chlorine bleaching. Enzyme Microb. Technol. 16, 492-495.
- RAHALKAR, S.B.; JOSHI, S.R.; SHIVARAMAM, N. Photometabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. Curr. Microbiol., 26(1): 1-9, 1993.

- RÄTTÖ, M.; MATHRANI, M.; AHRING, B.; VIKARI, L. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp in enzymatic treatment of kraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol., 41: 130-133, 1994.
- REID, I.D.; PAICE, M.G.; HO, C.; JURASEK, L. Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. TAPPI J., 73: 149-153, 1990.
- REILLY, P.J. Xylanases: structure and function. In: Alexander Hollaender. Trends Biol. Ferm. for Fuels and Chemicals, 11-129, 1981.
- ROBINSON, P.D. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Biotechnol. Lett., 6(2): 119-122, 1984.
- RODIONOVA, N.A.; TABOBILOV, I.M.; BEZBORODOV, A.M. β -Xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. J. Appl. Biochem., 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 growth on bagasse pith. Biotechnol. Lett., 13(3): 563-566, 1991.
- SAKKA, K.; MAEDA, Y.; HAKAMADA, Y.; TAKAHASHI, N.; SHIMADA, K. Purification and some properties of xylanase from *Clostridium stercorarium* strain HX-1. Agric. Biol. Chem., 55 (1): 247-248, 1991.

- SANCHEZ, C.; HALWARD, A. Métodos de ensaio nas indústrias de celulose e papel. Ed. Brusco, São Paulo, 299, 1975.

- SAXONE, S.; BAHADUR, J; VARMA, A. Production and localization of carboxymethylcellulase, xylanase and glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 34: 668-670, 1991.

- SENIOR, D.J.; MAYERS, P.R.; SADDLER, J.N. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32: 137-142, 1989.

- SENIOR, D.J.; HAMILTON, J. Biobleaching with xylanases brings biotechnology to reality: economic and environmental advantages of using xylanases in bleach plants from the mill. Pulp and Paper (sept); 111-114, 1992.

- 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 cellulase and β -xylosidase while maintaining low protease production. Biotechnol. Bioeng., 38: 883-890, 1991.

- SMITH, D.C.; BHAT, K.M.; WOOD, T.M. Xylan-hydrolyzing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. World J. Microbiol. Biotechnol., 7: 475-484, 1991.

- SMITH, D.C.; FORSBERG, C.W. α -Glucuronidase and other hemicellulases activities of *Fibrobacter succinogenes* S₈₅ grown on crystalline cellulose or ball-milled barley straw. Appl. Environ. Microbiol., 57: 3552-3557, 1991.

- SUNBERG, M.; POUTANEN, K.; MARKKANEN, P.; LINKO, M. An extracellular esterase of *Aspergillus awamori*. Biotechnol. Appl. Biochem., 12: 670-680, 1990.
- SUNBERG, M.; POUTANEN, K. Purification and properties of two actylxylan esterases of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Appl. Biochem., 13: 1-11, 1991.
- SYKES, , M. Environmental compatibility of effluents of Aspen biomechanical pulps. TAPPI J., 77: 160-166, 1994.
- SUURNÄKKI, A.; KANTELINEN, A.; HORTLING, B.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. Enzymatic solubilization of hemicelluloses in industrial softwood kraft pulps. Holzforschung, 48: 291-296, 1994.
- SUNDQUIST, J. Towards cleaner technologies in pulp and paper manufacture. Paperi Ja Puu-Paper Timber, 76: 22-26, 1994.
- TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can. J. Microbiol., 33 (8): 689-692, 1987.
- TAPPI. Test Methods, Atlanta, TAPPI press, 1988.
- TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microbiol. Technol., 14: 566-74, 1992.
- TIMELL, T.E. Wood Hemicelluloses: Part II. Adv. Carboh. Chem. Biochem., 19: 409-83, 1965.

- THORNTON, J.; TENKANEN, M.; EKMAN, R.; HOLMBOM, B.; VIKARI, L. Possibility of increasing mechanical pulp yield by enzymatic treatment. Holzforschung, 48: 436-440, 1994.

- TODESSE, B.; DONALDSEN, J.D.; GRIMES, S.M. Contaminated and polluted land: A general review of decontamination management and control. J. Chem. Technol. Biotechnol., 60: 227-240, 1994.

- TOLAN, J.S.; CANOVAS, R.V. The use of enzymes to decrease the Cl_2 requirements in pulp bleaching; Xylanase enzymes improve effectiveness of conventional chemical bleaching. Pulp Paper Can., 93 (5) : 39-42, 1992.

- TRIGO, C.; BALL, A.S. Production of extracellular enzymes during the solubilization of straw by *Thermomonospora fusca* BD25. Appl. Microbiol. Biotechnol., 41: 366-372, 1994.

- UCHINO, F.; NAKANE, T. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem., 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 xylanase in bread making and preparation of feed and paper products. 1990 European Patent Appl. 90/202, 020, 1990.

- VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; LINKO, M.; SUNDQUIST, J. Application of enzymes in bleaching. IN: Intern. Symp. Wood and Pulping Chemistry, 1: 151-54, Paris , 1987.

- VIIKARI, L. Pulp and the environmental. Paperi ja Puu-Paper and Timber, 73(5): 384-389, 1991.

- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; RÄTTÖ, M.; SUNDQUIST, J. Enzymes in pulp and paper processing. In: LEATHAM, G.F.; HIMMEL, M.E. Enzymes in Biomass Conversion, 2: 12-21, 1991.

- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; BUCHEERT, J.; PULS, J. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol., 41: 124-129, 1994.

- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. Microb. Gen. Bull., 13: 42-43, 1956.

- WAGNER, B.A.; TELLER, T.D.E.; MCCARTHY, J.L. Estimation of the distribution of molecular weights of lignins by the use of low pressure size exclusion chromatography. Holzforschung, 40 (suppl.): 67-73, 1986.

- WILLIAMS, A.G.; WITHER, S.E. The regulation of xylanolytic enzyme formation by *Butyrivibrio fibrisolvens* NCFB 2249. Lett. Appl. Microbiol., 14(5): 194-198, 1992.

- WOODWARD, J. Xylanases: Functions, properties and applications. IN: Wiseman, A. Topics in Enzyme and Fermentation. Biotechnology, 1984.

- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of xylanase in microorganisms; Functions; Properties and Applications. Microbiol. Rev., 52(13): 305-317, 1988.

- WONG, K.K.Y; SADDLER, J.N. *Trichoderma* xylanase, their properties and applications. Critical Rev. Biotechnol., 12(5/6): 413-435, 1992.
- YANG, J.L.; ERIKSSON, K. Use of Hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps. Holzforschung, 46 (6): 481-488, 1992.
- YANG, J.L.; SACON, V.M.; LAW, S.E.; ERIKSSON, K. Bleaching of *Eucalyptus* kraft pulp with the EnZone process. TAPPI J. 76 (7), 91-96, 1993.
- YANG, J.L.; COTES, D.H.; LOW, S.E.; ERIKSSON, K.-E.L. Bleaching of softwood kraft pulps with the EnZone process, TAPPI J. 77: 243-250, 1994.
- YASUI, T.; MARUI, M.; KUSAKABE, I.; NAKANISHI, K. Xylanases of *Streptomyces*. Methods Enzymol., 160: 648-654, 1988.
- ZIMMERMAN, W. Hemicellulolytic enzyme systems from actinomycetes. Enzyme synthesis for lignocellulose degradation (Coughlan, M.P.), Elsevier, 4: 167-181, 1990.

APÊNDICE

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									

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