

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS DE FUNGO *Aspergillus flavus*  
ISOLADO DE SOLO AMAZÔNICO.

Bolsista: Paola Guidobono Nunes, FAPEAM  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Leonor Alves O. da Silva

Manaus  
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL  
PIB – B 0009/2009  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS DE FUNGO *Aspergillus flavus*  
ISOLADO DE SOLO AMAZÔNICO.

Bolsista: Paola Guidobono Nunes, FAPEAM  
Orientadora: Dr<sup>a</sup> Leonor Alves O. da Silva

Manaus  
2010

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	05
OBJETIVOS .....	08
MATERIAIS E MÉTODOS .....	09
<b>MATERIAIS</b> .....	09
Solo.....	09
Microrganismo.....	09
Fonte de carbono.....	09
Controle negativo para fonte de carbono.....	09
<b>MÉTODOS</b> .....	10
Cultivo e manutenção.....	10
Preservação.....	10
Suspensão de esporos para inoculação.....	11
Contagem de esporos.....	11
Seleção da fonte de carbono.....	11
Extração do filtrado de cultura.....	12
Cinética e modo de produção enzimática.....	12
Influência do pH e temperatura na produção enzimática.....	13
Seleção do meio mínimo para produção.....	13
Determinação da atividade enzimática.....	15
Dosagem de proteínas totais.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	17

<b>ANALISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscopia, <i>Aspergillus flavus</i> .....	05
Figura2 – Composição da parede celular dos vegetais.....	07
Figura3 – <i>Aspergillus flavus</i> .....	09
Figura 4 – Microrganismo cultivado.....	10
Figura5 – Preservação em Glicerol 2%.....	10
Figura 6 – Inoculo para seleção de fonte de carbono.....	11
Figura 7 - Perfil da produção em U/mL do complexo xilanolítico por <i>A. flavus</i> .....	19
Figura 8 – Perfil da produção em U/ mg de proteína do complexo xilanolítico por <i>A. flavus</i> .....	20
Figura 9 – Efeito das diferentes temperaturas.....	21
Figura 10 – Efeito do pH na produção do complexo enzimático xilanolítico excretado por <i>A. flavus</i> .....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes do meio Czapec.....	13
Tabela 2 – Planejamento Fatorial.....	16
Tabela 3 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção do complexo xilanolítico excretado por <i>Aspergillus flavus</i> .....	19
Tabela 4 – Seleção do meio mínimo para produção do complexo xilanolítico excretado por <i>A. flavus</i> .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos eucarióticos, unicelulares como as leveduras ou, em sua maioria, pluricelulares ditos filamentosos. Segundo Ritter (2007, p.01), podem ser encontrados em diversos ambientes como água, ar e solo.

Alterthumm (2008, p. 10, 11) ressalta que características como a falta de amido armazenado como material de reserva e a estrutura da membrana citoplasmática lipoprotéica (cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente), bem como a importância dos esporos, constituem elementos importantes na identificação dos microrganismos.

No solo, os fungos são encontrados como células ou estruturas de repouso (esporos), em comunidades variáveis de  $10^4$  a  $10^7$  organismos por grama de solo. Embora não sejam predominantes em termo numérico, a Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS) em seu Manual de Ciências Agrárias nos Trópicos Brasileiros de 1992 os denominam como parte de 70 a 80% da Biomassa microbiana da maioria dos solos. Sua ocorrência está vinculada ao alto teor de matéria orgânica, sendo também influenciada ao pH e a umidade do solo.

A região amazônica tem em grande expressão geográfica o Latossolo Amarelo. Segundo dados da EMBRAPA (1999), o solo da região amazônica é classificado como Latossolo Amarelo distrófico, típico e muito argiloso. Além destas características, o solo é profundo, ácido e úmido, quesitos importantes para o desenvolvimento de comunidades fungicas onde freqüentemente não há competição com bactérias e actinomicetos.



Figura 1 – Microscopia, *Aspergillus flavus*  
Fonte: Google acessado 11.01.10

Dentre os fungos mais representativos do solo se encontram os do gênero *Aspergillus* da espécie *flavus*, onde sua principal função é decompor os restos vegetais nele depositados. Os fungos deste gênero são caracterizados pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes, como verdes e amarelo-oliva, comumente implicado na contaminação de alimentos.

Basicamente as necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos, que, para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades, exigem fontes de energia [...]. Os fungos [...] são

quimiotróficos, obtendo energia às custas de reações químicas onde substratos adequados são oxidados. (ALTERTHUMM, 2008, p 13)

Park & Bullermann (1983), citado por Ritter (2007 p.09), afirma que “o substrato é um dos mais importantes fatores que determinam o crescimento fungico [...]”. Para crescerem nesses variados substratos, “[...] são capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas que provocam deterioração. (RITTER, 2007 p. 01).

O uso de células microbianas como fonte de enzimas foi largamente implementado em escala industrial, permitindo não só o aumento na produção de enzimas já obtidas por outros processos, mas também a produção de novas enzimas de interesse comercial. Como resultado, o mercado global de enzimas industriais saltou de 300 milhões de dólares na década de 80 para a impressionante cifra de 1,6 bilhões de dólares no final da década de 90 (DEMAIN, 2000 *apud* CANILHA *et alli*, 2006 p. 37).

As principais vantagens de se utilizar células microbianas como fontes de enzimas são: obtenção de elevadas concentrações de enzimas através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microorganismos super-produtores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso (TIMMIS e DEMAIN, 1998 *apud* CANILHA, 2006 p.37).

As enzimas produzidas por fungos são geralmente proteínas globulares, e como todas as proteínas, são heteropolímeros de vinte diferentes aminoácidos. Torres (2008, p. 157), explica que “[...] o que caracteriza cada enzima é o número de aminoácidos componentes em sua cadeia e a ordem em que eles se encontram”.

Dentre as enzimas produzidas pelo *A. flavus*, encontra-se o complexo enzimático xilanolítico ou xilanases.

As xilanases formam o maior grupo de hidrolases envolvidas na degradação de xilano, citado por Reis *at all*, (2003) como o maior constituinte, hemicelulósico, da parede celular das plantas. Georis *et al* (2000) *apud* Alberton (2004), descreve as hemiceluloses como polissacarídeos de baixo peso molecular não celulósicos e não amiláceos, associados com a celulose e a lignina nas células das plantas.

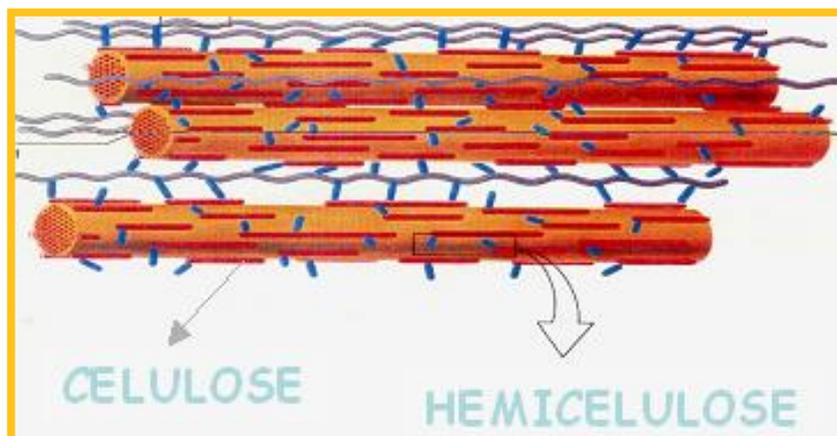


Figura 2 – Composição da parede celular dos vegetais  
 Fonte: Centro de ciências agrárias – UFSCar

Na natureza, o xilano é completamente hidrolizado por uma ação sinérgica de diversas enzimas, ou seja, de um complexo enzimático xilanolítico incluindo principalmente  $\beta$ -1,4 D-xilanases e  $\beta$ -D-xilobiose (MEDEIROS, p. 23, 2007)

Durante a última década, o potencial das aplicações biotecnológicas do xilano têm sido de interesse dos pesquisadores. As enzimas xilanolíticas oferecem diversas aplicações industriais, como por exemplo na área alimentícia, na qual é utilizada para a clarificação de sucos e vinhos, fabricação de pães e cerveja. (MACIEL, 2006).

Os fungos constituem a fonte mais comum de xilanases (DEKKER; RICHARDS, 1976 *apud* MEDEIROS, p.25, 2007). Em escala industrial, as xilanases são produzidas principalmente por *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH *at all*, 1996 *apud*, RUEGGER, 2002).

Seguindo esta linha de raciocínio, o projeto em questão baseia-se em todas as informações expostas acima. Tendo em vista a viabilidade da produção enzimática pelo microrganismo *Aspergillus flavus* componente da microbiota do solo Amazônico. Ressaltando também, a importância de pesquisas relacionadas a espécies, com valor imensurável, para as inovações tecnológica, a fim de desenvolver na região processos economicamente competitivos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

2.1.2 Otimizar a produção do complexo enzimático xilanolítico excretado pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, isolado do solo amazônico.

### 2.2 Específicos:

2.2.1 Avaliar a produção do complexo enzimático em diferentes substratos indutores;

2.2.2 Otimizar o tempo, modo de cultivo, pH e temperatura de produção;

2.2.3 Otimizar o meio mínimo indutor para a produção do complexo enzimático.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Solo

Foram utilizadas amostras de solos retiradas dos canteiros localizados próximos aos laboratórios do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM).

##### 3.1.2 Microrganismo

O fungo filamentososo *Aspergillus flavus* utilizado neste projeto, anteriormente isolado de amostras de solo em 2008, obtidas do Mini-Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada na cidade de Manaus – Amazonas/ Brasil, foi cedido pela bolsista Flávia de Carvalho Paiva da UFAM após selecionado qualitativamente quanto a sua produção enzimática xilanolítica (PIB – B/0002/2008)



Figura 3 – *Aspergillus flavus*  
Fonte: Paola Nunes, 2009

##### 3.1.3 Fontes de Carbono

As fontes de carbono (Sabugo de milho, Bagaço de cana e Farelo de trigo) utilizadas durante a seleção de melhor indutor para o complexo enzimático em questão foram cedidas pela Orientadora do projeto Dr<sup>a</sup> Leonor Alves Oliveira da Silva.

##### 3.1.4 Controle Negativo para fonte de carbono

A glicose utilizada como controle negativo durante a seleção de fonte de carbono indutora da produção do complexo enzimático xilanolítico foi cedida pelo laboratório de Fermentação do CAM.

### 3.2 Métodos

#### 4.2.1 Cultivo e manutenção

Para o cultivo e manutenção do fungo *Aspergillus flavus*, utilizou-se o meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) preparados manualmente com extrato de batata e contidos em placas de Petri e tubos de ensaio inclinados. As linhagens permaneceram incubadas a temperatura 27°C por um período de sete dias, onde passaram por sucessivos repiques no decorrer do projeto.



Figura 4 – Microrganismo cultivado  
Fonte: Paola Nunes, 2009

#### 3.2.2 Preservação

A preservação do microrganismo foi efetuada em água destilada (CASTELLANI, 1939) e em glicerol 2%.



Figura 5 – Preservação em glicerol 2%  
Fonte: Paiva, 2009

### 3.2.3 Suspensão de esporos para inoculação

Depois de transcorrido o tempo de incubação para o devido crescimento do microrganismo, foi realizada a suspensão de esporos, onde, em ambiente estéril, adicionou-se 10 mL de água destilada autoclavada nas culturas e efetuada a raspagem com *swabb*.

### 3.2.4 Contagem de esporos

A contagem de esporos foi realizada através da Câmara de Neubauer em microscópio óptico. A quantidade de esporos utilizada como padrão para os inóculos efetuados durante o projeto foi baseada em estudos anteriores realizados por Leonor Alves de Oliveira da Silva.

### 3.2.5 Seleção da fonte de carbono

Para a seleção da melhor fonte de carbono utilizou-se 1 mL da suspensão de esporos com uma concentração de  $10^7$  esporos/mL inoculadas em 50 mL de meio líquido contendo a solução de micro-nutrientes Czapek e 1% m/v do substrato utilizado como fonte de carbono bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo. Para o controle negativo de produção enzimática utilizou-se a glicose como fonte de carbono.

O inóculo permaneceu cinco dias em condições estacionárias e a temperatura de 27°C.



Figura 6 – Inóculo do fungo para seleção de fonte de carbono.

Fonte: Paola Nunes, 2009

Tabela 1. Composição do meio líquido Czapek

	1000 mL
- Água destilada	1000 mL
- Fonte de carbono (bagaço de cana, sabugo de milho, farelo de trigo ou glicose)	10 g
- Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )	3,0 g
- Fosfato Potássico dibásico anidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1,0 g
- Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,5 g
- Cloreto de Potássio ( $\text{KCl}$ )	0,5 g
- Sulfato Ferroso hidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	10 mg
- Ágar	20 g

### 3.2.6 Extração do filtrado de cultura

Transcorrido o período de fermentação sob diferentes fontes de carbono, os inóculos foram submetidos à filtração a vácuo para a separação do filtrado de cultura, que posteriormente foram submetido a dosagens de açúcar redutor pelo método de Miller (1959) e proteínas totais por Bradford (1976), conforme descrito no item 3.2.10.

### 3.2.7 Cinética e modo de produção enzimática

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise de concentração de um ou mais componentes do sistema [...] em função do tempo de fermentação (HISS, p. 93 2007). Baseando-se nesta informação, o procedimento experimental será realizado conforme descrito abaixo.

Após a seleção da fonte de carbono foi efetuada a curva de crescimento do microrganismo em questão obtendo-se o pico de produção enzimática. O mesmo, novamente foi inoculado em Czapek com 1% m/v de sabugo de milho. Os ensaios foram realizados em triplicata, onde o inóculo permaneceu por um período de sete dias a 30°C sob condições estacionárias e agitadas em incubadora com agitação (150 rpm).

Durante os sete dias de fermentação foram retiradas alíquotas de 1 mL de 24/24 horas, as mesmas foram centrifugadas à 13,2 X 1000 rpm durante cinco minutos para a separação das células. O sobrenadante foi coletado para a análise de produção enzimática extracelular através dos métodos de dosagem de açúcar redutor e proteínas totais descritos no tópico 3.2.10.

### 3.2.8 Influência do pH e temperatura na produção enzimática.

Quaisquer processos biológicos são dependentes da temperatura e do pH, já que estes fatores podem afetar na desnaturação das proteínas, ativação e/ou inibição das enzimas, promoção ou inibição de subprodutos do metabolismo celular, vida útil dos microorganismos, rendimento da fermentação, etc (PANDEY, 2001, SHIMIDELL, 2001 *apud* SILVA, p. 02).

Tendo em vista a seleção da fonte de carbono, e designadas às condições de cultivo e pico de produção, será realizado ensaios que indicarão a influência do pH e da temperatura sob o processo fermentativo bem como seus valores ótimos para produção enzimática.

Os ensaios serão realizados em triplicata, serão submetidos a diferentes temperaturas sob a condição de cultivo selecionada, posteriormente, novos ensaios foram realizados, onde, seus pHs iniciais foram ajustados em diferentes pontos mantendo-se constantes as demais condições.

### 3.2.9 Seleção de meio mínimo para produção

O planejamento fatorial é comumente utilizado quando se pretende avaliar a influência de mais de um fator que interfere em um resultado final, desenvolvendo um número X de combinações entre eles.

Com a intenção de otimizar a produção do complexo enzimático excretado pelo microrganismo *Aspergillus flavus*, se utilizará a ferramenta de planejamento fatorial para os cinco

componentes da solução de micronutrientes Czapeck. Para cinco variáveis independentes, há 2 níveis e 3 pontos centrais.

Tabela 2. Planejamento fatorial

	<b>Nitrato de sódio</b>	<b>Fosfato Dibásico de Potássio</b>	<b>Sulfato de Magnésio</b>	<b>Cloreto de Potássio</b>	<b>Sulfato Ferroso</b>
<b>1</b>	0,60000	0,200000	0,100000	0,100000	0,002000
<b>2</b>	15,00000	0,200000	0,100000	0,100000	0,002000
<b>3</b>	0,60000	5,000000	0,100000	0,100000	0,002000
<b>4</b>	15,00000	5,000000	0,100000	0,100000	0,002000
<b>5</b>	0,60000	0,200000	2,500000	0,100000	0,002000
<b>6</b>	15,00000	0,200000	2,500000	0,100000	0,002000
<b>7</b>	0,60000	5,000000	2,500000	0,100000	0,002000
<b>8</b>	15,00000	5,000000	2,500000	0,100000	0,002000
<b>9</b>	0,60000	0,200000	0,100000	2,500000	0,002000
<b>10</b>	15,00000	0,200000	0,100000	2,500000	0,002000
<b>11</b>	0,60000	5,000000	0,100000	2,500000	0,002000
<b>12</b>	15,00000	5,000000	0,100000	2,500000	0,002000
<b>13</b>	0,60000	0,200000	2,500000	2,500000	0,002000
<b>14</b>	15,00000	0,200000	2,500000	2,500000	0,002000
<b>15</b>	0,60000	5,000000	2,500000	2,500000	0,002000
<b>16</b>	15,00000	5,000000	2,500000	2,500000	0,002000
<b>17</b>	0,60000	0,200000	0,100000	0,100000	0,050000
<b>18</b>	15,00000	0,200000	0,100000	0,100000	0,050000
<b>19</b>	0,60000	5,000000	0,100000	0,100000	0,050000
<b>20</b>	15,00000	5,000000	0,100000	0,100000	0,050000
<b>21</b>	0,60000	0,200000	2,500000	0,100000	0,050000
<b>22</b>	15,00000	0,200000	2,500000	0,100000	0,050000
<b>23</b>	0,60000	5,000000	2,500000	0,100000	0,050000
<b>24</b>	15,00000	5,000000	2,500000	0,100000	0,050000
<b>25</b>	0,60000	0,200000	0,100000	2,500000	0,050000
<b>26</b>	15,00000	0,200000	0,100000	2,500000	0,050000
<b>27</b>	0,60000	5,000000	0,100000	2,500000	0,050000
<b>28</b>	15,00000	5,000000	0,100000	2,500000	0,050000
<b>29</b>	0,60000	0,200000	2,500000	2,500000	0,050000
<b>30</b>	15,00000	0,200000	2,500000	2,500000	0,050000
<b>31</b>	0,60000	5,000000	2,500000	2,500000	0,050000
<b>32</b>	15,00000	5,000000	2,500000	2,500000	0,050000
<b>33 (C)</b>	3,0000	1,00000	0,5000000	0,5000000	0,0100000

<b>34 (C)</b>	3,0000	1,00000	0,5000000	0,5000000	0,0100000
<b>35 (C)</b>	3,0000	1,00000	0,5000000	0,5000000	0,0100000

3.2.10 Determinação da atividade enzimática xilanolítica e dosagem de proteínas totais

Todos os procedimentos experimentais serão caracterizados quanto sua viabilidade conforme os resultados obtidos através das determinações enzimáticas xilanolíticas e dosagem de proteínas totais.

#### 3.2.10.1 Quantificação da atividade enzimática xilanolítica

Segundo Miller (1959), a determinação da atividade enzimática xilanolítica consiste em: reacionar 750  $\mu$ L de xilano a 1%, utilizado como substrato bruto, adicionada a 400  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 6,0 e a 100  $\mu$ L do complexo enzimático, excretada pelo microrganismo, e incubar por um período de 10 minutos a 50°C. Transcorrido o tempo reacional adicionar 250  $\mu$ L de reagente Ácido dinitro-salicílico (ADNS) para então incubar a reação a 100°C por 5 minutos. Em seguida adicionar 2,5 mL de água destilada autoclavada e homogeneizar por inversão. A leitura de absorbância é realizada em espectrofotômetro UV a 540 nm. Os ensaios serão realizados em triplicata, o branco reacional não é incubado a 50°C por 10 minutos.

O resultado consisti em uma unidade de atividade enzimática definida como à liberação de 1  $\mu$ mol de açúcar redutor, equivalente a xilose, por minuto por mL de amostra, nas condições de ensaio. A atividade específica será expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína.

### 3.2.10.2 Dosagem de proteínas totais

O método de dosagem de proteínas totais será realizado segundo Bradford 1976, onde 800  $\mu\text{L}$  de amostra com tampão Acetato de sódio 50 mM pH 6,0 é adicionada a 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford para então ser incubada durante cinco minutos a temperatura ambiente e mensurada em espectrofotômetro UV em um comprimento de onda de 595 nm. No branco reacional não há amostra, apenas tampão.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 A influência da fonte de carbono sobre a produção de xilanase pelo fungo

##### *Aspergillus flavus*

A composição do meio de cultivo, modo de cultivo, pH, temperatura, tempo de cultivo e fonte de carbono são parâmetros fundamentais para a produção de diversas enzimas. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção do complexo xilanolítico excretado pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, isolado de solo amazônico, foram testadas diferentes fontes de carbono.

Tendo em vista que a escolha do substrato indutor apropriado é um importante fator para otimização da produção de xilanase (HALTRICK,1996;KULKARNI *et al.*,1999), o fungo *A. flavus* foi cultivado de forma estacionária a 32 °C, por sete dias de em meio líquido contendo 1,0 % (m/v) de diferentes fontes de carbono naturais (sabugo de milho, bagaço de cana e farelo de trigo). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos com as diferentes fontes de carbono testadas, capazes de induzir a atividade xilanolítica.

Tabela 3. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção do complexo xilanolítico excretado por *Aspergillus flavus*.

Fonte de carbono	Atividade (U/mL)	Proteína (µg/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína)
Bagaço de cana	3,166	0,001	3,166
Farelo de trigo	4,676	84,429	55,407
Sabugo de milho	23,845	228,979	104,172
glicose	0,000	0,00	0,000

A Tabela 3 nos mostra que, dentre os substratos ensaiados, o sabugo de milho, utilizado como fonte de carbono, se destacou, apresentando um valor de atividade enzimática correspondente a 23,845 U/mL e 104,172 U/mg de proteína. Analisando os valores de atividade em U/mL detectamos que o sabugo de milho mostrou-se 7,5 vezes superior ao bagaço de cana e 5,1 vezes superior ao farelo de trigo. Avaliando os resultados de atividade específica encontramos que o Sabugo de milho foi superior 32,9 vezes ao bagaço de cana e 1,99 vezes superior ao farelo

de trigo. Estes resultados indicam que fontes alternativas de carbono podem ser utilizadas como indutoras da síntese de xilanases.

Na literatura encontram-se diferentes trabalhos que utilizam outros indutores na produção de xilanase. Xiong et al.(2005)verificaram que hidrolisados de plantas ricos em L-arabinose induziram a síntese de xilanases por *T.reesei* rut C-30.Gattinger et al.(1990)obtiveram elevados valores de atividade xilanase de *T.reesei* em meios contendo farinha de canola como substrato. Seyis e Aksoz (2005) estudaram alguns resíduos naturais na produção de xilanase por *T.harzianum* 1073 D3,e dentre os analisados,a casca de melão exibiu os mais elevados valores de atividade xilanase. Silva e Carmona, 2008, trabalhando com *T. inhamatum* inoculado em meio líquido de Vogel com 1% de Sabugo de milho, obteve 10, 41 U/mL de atividade xilanolítica.

#### 4.2 Cinética de produção do complexo xilanolítico de *Aspergillus flavus*

O estudo da produção de xilanase com a idade da cultura foi realizado a fim de se determinar o tempo de cultivo correspondente à maior produção enzimática sob condições estacionárias a 32 ° C e com agitação de 150 rpm,a 32 ° C em meio líquido de Czapeck, contendo 1,0 % (m/v) de sabugo de milho (Figura 7)

A Figura 7 apresenta os resultados de atividade do complexo xilanolítico em U/mL, obtidos para o perfil cinético de produção de xilanase em cultivo agitado e estacionário.

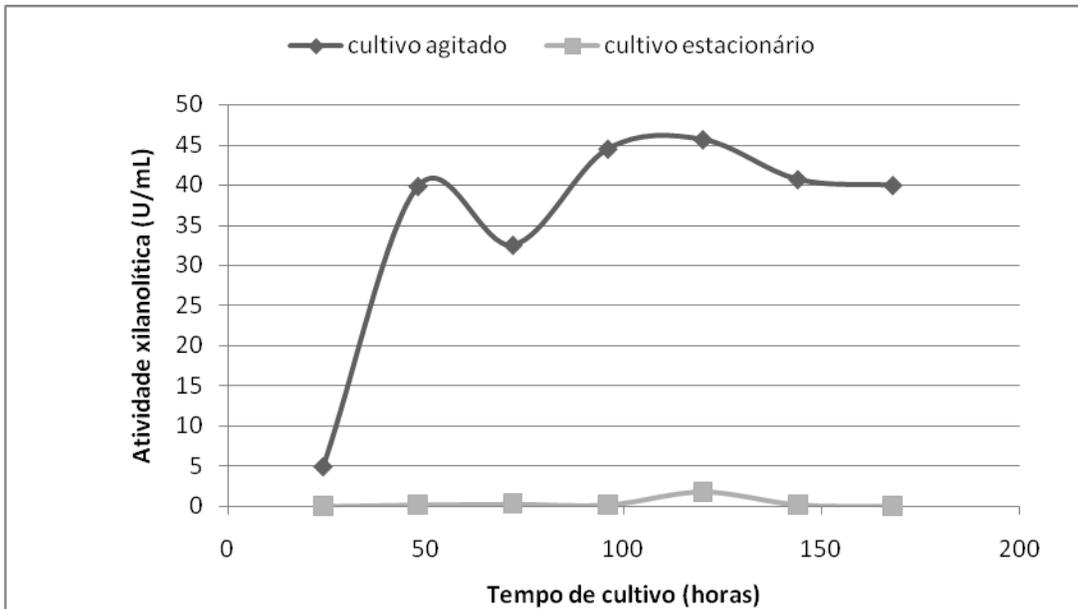


Figura 7. Perfil da produção em U/mL do complexo xilanolítico por *A. flavus*, em condições estacionária e agitada 150 rpm, á 32°C com 1% (m/v) de Sabugo de milho como fonte de carbono.

O perfil cinético de produção de xilanase em cultivo estacionário (Figura 7) apresentou um pico de atividade enzimática extracelular no quinto dia ou 120 horas (1,76 U/mL), com uma queda no sexto dia ou 144 horas (0,21 U/mL), o perfil cinético em cultivo agitado, apresenta um primeiro pico de atividade no segundo dia ou 48 horas (39,88 U/mL), com uma queda no terceiro dia ou 96 horas seguido de um segundo pico de maior intensidade no quinto dia ou 120 horas (45,7 U/mL) seguido de queda progressiva até o sétimo dia. Todos os extratos correspondentes aos complexos enzimáticos foram submetidos á dosagem de proteína obtendo um perfil cinético correspondente á atividade específica ilustrado na Figura 8.

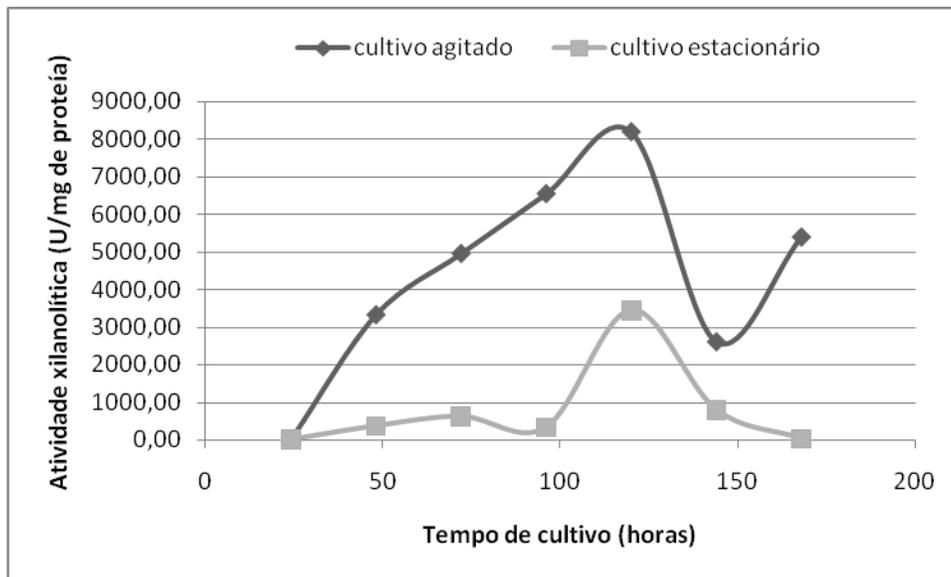


Figura 8. Perfil da produção em U/ mg de proteína do complexo xilanolítico por *A. flavus*, em condições estacionária e agitada 150 rpm, á 32<sup>o</sup>C com 1% (m/v) de Sabugo de milho como fonte de carbono.

Analisando as figuras 7 e 8, correspondentes as atividades em U/mL e U/mg de proteínas foi detectado picos de produção com 120 horas de cultivo tanto em condição estacionária como em agitação de 150 rpm. Analisando os valores de atividade específica, o modo agitado mostrou-se 237,97% superior ao modo estacionário.

Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho e Carmona (2003), quando estudaram a cinética da produção do complexo xilanolítico de *A. i. anteus* em meio líquido de Vogel com xilano de aveia como fonte de carbono. Comparando-se o cultivo estacionário frente ao cultivo em agitação, os autores obtiveram para o referido fungo picos de produção em 120 e 84 horas respectivamente. Seyis e Aksoz (2005) também utilizando xilano de aveia como fonte de carbono, em condição estacionária, verificaram os maiores níveis de produção de xilanase com 312 h de cultivo para *T. harzianum* 1073 D3.

Nos estudos posteriores, padronizou-se o tempo de cultivo para o *Aspergillus flavus* no referido meio, em 120 horas com agitação de 150 rpm.

### 4.3 Influência do pH e temperatura sobre a produção de xilanase por *Aspergillus*

#### *flavus*

Nessa etapa, foram estudados os efeitos das variações de pH e temperatura, visando otimizar a produção do complexo xilanolítico de *Aspergillus flavus* em cultivo agitado.

Para o estudo da temperatura, o referido fungo foi inoculado em meio líquido Czapeck, permanecendo durante cinco dias sob agitação (150 rpm) em diferentes temperaturas, 20°C, 30°C, 40°C e 50°C. A figura 9 ilustra o perfil das atividades enzimáticas em função dessa variável.

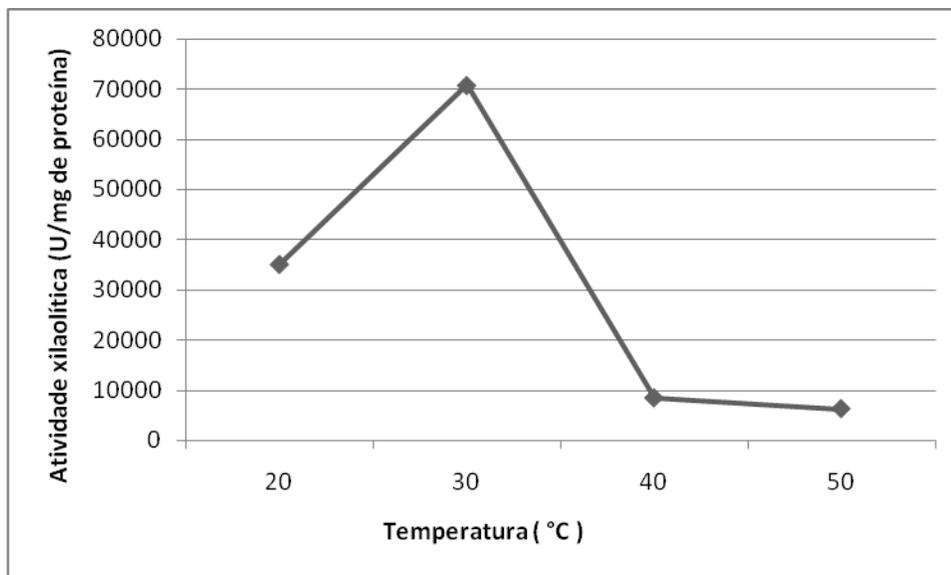


Figura 9. Efeito das diferentes temperaturas em U/mg de proteína na produção do complexo xilanolítico excretado por *Aspergillus flavus*.

A temperatura de 30°C apresentou maior influência na produção do complexo xilanolítico excretado por *A. flavus* assemelhando-se a estudos referentes a xilanases de *A. versicolor* (CARMONA et al., 1997), onde, 30 °C foi determinada como temperatura ótima de produção.

Para estudo do efeito do pH, a linhagem foi cultivada em meio líquido de Czapeck com 1% (m/v) de sabugo de milho, permanecendo cinco dias a 30 °C tendo o seu pH inicial ajustado de 3,0 a 8,0.

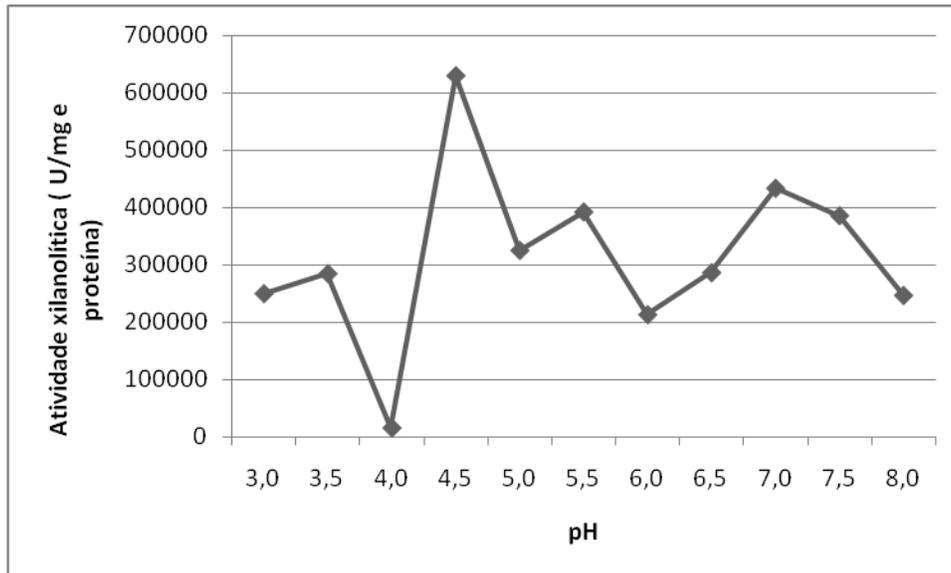


Figura 10. Efeito do pH na produção do complexo enzimático xilanolítico excretado por *A. flavus*.

A Figura 10 ilustra o perfil da atividade enzimática em função dessa variável. Os valores mais altos de atividade xilanase extracelular foram detectados em culturas de pH 4,5 e 7 sendo observada a maior atividade em pH 4,5 (62,905 U/mL), resultados diferentes foram observados por Coelho e Carmona (2003) onde a maior produção de xilanase por *A. giganteus* foi pH inicial 7,0.

#### 4.4. Seleção do meio mínimo para a produção do complexo xilanolítico excretado por *A. flavus*

Na etapa de seleção do meio mínimo para a produção do complexo xilanolítico excretado por *A. flavus*, o referido fungo foi inoculado em meio líquido Czapeck, com concentrações de seus componentes modificadas (Tabela 2), com 1% (m/v) de sabugo de milho e pH inicial ajustado em 4,5, permanecendo cinco dias a 30°C em cultivo agitado (150 rpm).

Tabela 4. Seleção do meio mínimo para produção do complexo xilanolítico excretado por *A. flavus*.

<b>Amostra</b>	<b>U/mL</b>	<b>□ mg/mL</b>	<b>U/mg proteína</b>
1	1,491	0,00006	24850
2	1,771	0,00007	25300
3	1,864	0,00007	26629
4	3,706	0,00007	52943
5	2,424	0,00006	40400
6	1,818	0,00006	30300
7	1,794	0,00006	29900
8	1,678	0,00006	27967
9	2,144	0,00006	35733
10	2,494	0,00006	41567
11	1,608	0,00006	26800
12	2,167	0,00006	36117
13	2,284	0,00006	38067
14	2,408	0,00007	34400
15	1,989	0,00010	19890
16	2,268	0,00010	22680
17	2,105	0,00007	30071
18	1,864	0,00008	23300
19	2,867	0,00009	31856
20	1,888	0,00010	18880
21	2,362	0,00009	26244
22	2,299	0,00007	32843
23	1,934	0,00008	24175

Ao compararmos os resultados obtidos da seleção de micronutrientes com os outros resultados anteriores, observamos discrepâncias nas atividades xilanolíticas em U/mL. Os resultados foram considerados inválidos com possíveis erros experimentais, não havendo a possibilidade de refazê-los de acordo com o cronograma proposto.

## 5. CONCLUSÃO

A maior produção de xilanase por *Aspergillus flavus* isolado de solo amazônico, foi obtida em meio líquido Czapeck contendo 1% (m/v) de sabugo de milho como fonte de carbono, em pH inicial 4,5, a 30°C e 150 rpm, por 120 horas.

Os resultados obtidos sugerem que, o complexo xilanolítico produzido por *Aspergillus flavus* apresenta vantajosas condições para as futuras aplicações industriais, podendo minimizar os custos de produção.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, Luiz Rômulo. Produção de xilanase em resíduos agroindustriais. 2004. 131f. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Área de concentração em saúde animal. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ALTERTHUMM. F. Elementos de Microbiologia. In: WALTER BORZANI. Biotecnologia industrial. São Paulo, 2008. v 1, p 10, 11, 13

BRASIL. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. Ciências agrárias nos trópicos brasileiros: Biotecnologia dom solo – fundamentos e perspectivas. 1992.

CANILHA L. *at all.* Aditivos alimentares produzidos por enzimas. Parte 3: Polissacarídeos e enzimas. Revista Analytica. Dezembro 2005/ Janeiro 2006 nº 20, p. 32 a 38.

FILHO, Domingo Fornasieri. Manual da cultura do milho. 2007. 576f. Campos de Jaboticabal.

MACIEL, Giselle Maria. Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. 2006. 146f. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

REIS S. *at all.* Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. Revista Acta Scientiarum: Biological Sciences. 2003, v. 25, n. 1, p. 221-225. Maringá.

RITTER, Ana Carolina. Potencial Toxigênico de *Aspergillus flavus* testados em diferentes meios e condições. 2007. 63f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia agrícola e do meio ambiente com ênfase em microbiologia de alimentos. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RUEGGER, M. J. S, TAUKE-TORNISIELO S.M. Produção de xilanases por fungos filamentosos isolados da estação ecológica de Juréia – Itatins SP Brasil. *Holos Environment*, 27/11/2002. vol 2, nº2, p. 185 – 194.

SILVA, Leonor de Oliveira. Produção, purificação e caracterização de xilanase por *T. inhamatum*. 2006. Tese de Doutorado em Microbiologia Aplicada, Unesp.

SILVA, Vitor Renam. Estudos preliminares sobre modelagem e simulação de processos fermentativos no estado sólido, p. 02. Trabalho não publicado.

SOUZA Z.M comportamento de atributos físicos de um latossolo amarelo sob agroecossistemas do Amazonas.

TORRES, Bayardo. Elementos de enzimologia. In: WALTER BORZANI. *Biotechnology Industrial*. São Paulo, 2008. v 1, p. 157.

**Resumo:**

Os fungos encontrados no solo constituem a fonte mais comum para a produção de enzimas de interesse industrial, como a xilanase, produzida principalmente por *Aspergillus* e *Trichoderma*. O complexo xilanolítico tem sido extensivamente estudado e empregado em vários processos biotecnológicos sendo considerado importante ferramenta para a indústria papeleira, têxtil e alimentícia em virtude das inúmeras vantagens econômicas e de engenharia que este oferece. O presente trabalho objetivou a otimização da produção do complexo enzimático xilanolítico excretado por *Aspergillus flavus* isolado de solo amazônico. O fungo, *A. flavus*, foi inoculado em meio líquido Czapeck e avaliado quanto a influência de diferentes fontes de carbono, temperatura, pHs, tempo e modo de cultivo. A detecção das atividades enzimáticas foi realizada através da quantificação dos açúcares redutores pelo método de Miller 1956. As melhores condições de cultivo para a maior produção do complexo xilanolítico foram observadas em fermentações submersas contendo sabugo de milho 1% (m/v) como fonte de carbono sob agitação de 150 rpm por 5 dias ou 120 horas a 30°C e com o pH inicial de 4,5. Os resultados obtidos sugerem que o complexo xilanolítico produzido por *Aspergillus flavus* isolado de solo amazônico, apresentam vantajosas condições para futuras aplicações industriais, podendo minimizar os custos da sua produção.