

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO
XILANOLÍTICOS PRODUZIDOS POR FUNGO FILAMENTOSO
ISOLADOS DA AMAZÔNIA.

Bolsista: Rafael Castro Araújo, CNPq

MANAUS

2011

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO
XILANOLÍTIICOS PRODUZIDOS POR FUNGO FILAMENTOSO
ISOLADOS DA AMAZÔNIA.

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

RELATÓRIO PARCIAL

PIB – B – 0015/2010

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO
XILANOLÍTICOS PRODUZIDOS POR FUNGO FILAMENTOSO
ISOLADOS DA AMAZÔNIA.

Bolsista: Rafael Castro Araújo, CNPq

Orientadora: Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS

2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

Resumo

Os recursos da biodiversidade amazônica ainda são pouco explorados, sendo essencial o estudo de micro-organismos isolados da amazônia como fonte de novas tecnologias para obtenção de sistemas enzimáticos com aplicações biotecnológicas. Este trabalho visa estudar as melhores condições de produção de xilanase utilizando resíduos regionais como substrato e caracterizar parcialmente o complexo enzimático excretado pelo fungo filamentosso extraído de solo amazônico. Utilizou-se a linhagem fúngica *Aspergillus sp.* XSCM1, onde a produção do complexo xilanolítico foi otimizada e o complexo parcialmente caracterizado. O micro-organismos excretou mais enzimas para o meio usando Sabugo de milho como substrato em um pH ácido (pH 5,0) e temperatura de 30 °C. O melhor pH inicial de produção foi pH 5,0 e temperatura ideal para o ensaio enzimático foi 65 °C, na caracterização observou uma boa estabilidade quanto ao pH, em uma faixa de 4,0 a 6,5 e estabilidade térmica em 50 °C. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ aparente são 138,88 mg/mL e 31,64 U/mL, respectivamente. Esse estudo mostra que a Amazônia tem um grande potencial para novos sistemas biocatalíticos com possibilidades de inserção no mercado de trabalho.

Palavras Chave – Xilanase, Fungos Amazônicos, Fermentação Líquida, Resíduos como substrato, potencial mercadológico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM ENZIMAS	3
2.2 XILANA	3
2.3 ENZIMAS XILANOLÍTICAS	3
2.4 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE XILANASES.....	4
2.5 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE XILANASES.....	4
2.5.1 Xilanases na composição de ração animal.....	4
2.5.2 Indústria alimentícia, pão e bebidas	5
2.5.3 Indústria Têxtil	5
3.0 METODOLOGIA	7
3.1 LINHAGEM, CULTIVO E MANUTENÇÃO	7
3.2 ATIVIDADE DE XILANASE	7
3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	7
3.4 INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO, TEMPO E MODO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DO COMPLEXO XILANOLÍTICO EXCRETADO POR FUNGO ISOLADO DO SOLO AMAZÔNICO.	7
3.5 DETERMINAÇÃO DO MELHOR PH E TEMPERATURA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO XILANOLÍTICO.	8
3.6 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO COMPLEXO ENZIMÁTICO EXCRETADO PELO FUNGO FILAMENTOSO.....	8
3.6.1 Determinação do pH e temperatura ótima do complexo xilanolítico.	8
3.6.2 Estabilidade do complexo xilanolítico a diferentes temperaturas e pHs.	8
3.6.3 Afinidade por diferentes substratos.....	9
3.6.4 Parâmetro cinéticos	9
3.7 TRATAMENTO DE DADOS	9
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	10
5.0 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	21
MEIO SABOURAUD	22
MEIO BDA.....	22
MEIO AGAR MALTE	22
MEIO LÍQUIDO DE VOGEL (1956).....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção do complexo xilanolítico em meio líquido de Vogel do contendo diferentes fontes de carbono a 30 °C em condição estacionária.	10
Figura 2 – Produção do complexo xilanolítico em meio líquido de Vogel sob agitação de 150 rpm com diferentes fontes de carbono.....	12
Figura 3 - Gráfico da determinação do pH ótimo de produção utilizando sabugo de milho como fonte de carbono. Utilizou-se tampão acetato nos pH's de 3,0 a 5,5 e tampão fosfato nos pH's de 6,0 a 8,0.....	13
Figura 4 - Avaliação da produção de xilanase em diferentes temperaturas nas condições de cultivo previamente determinadas.	14
Figura 5 - pH ótimo de atuação da xilanase excretada por <i>Aspergillus sp.</i>	15
Figura 6 - Temperatura ótima de atuação da xilanase excretada por <i>Aspergillus sp.</i>	15
Figura 7 - Influência do pH na estabilidade (24 h, 26 °C) do complexo enzimático excretado por <i>Aspergillus sp.</i>	16
Figura 8 - Estabilidade térmica do complexo xilanolítico de <i>Aspergillus sp.</i>	16
Figura 9 - Curva de saturação de xilanase utilizando xilana de birchwood como substrato....	17
Figura 10 - Gráfico de Lineweaver-Burke para xilanase excretada por <i>Aspergillus sp.</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, nos picos de produção em diferentes fontes de carbono 32 °C sem agitação.	11
Tabela 2 - Valores de atividades xilanolítica U/mL e atividade e xilanase específica em U/mg de proteínas, nos picos de produção em diferentes fontes de carbono a 30 °C sob agitação de 150 rpm.....	11
Tabela 3 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, em tampão acetato pH 5,0 50 mM utilizando sabugo de milho 1% como fonte de carbono a 30 °C com agitação.	13
Tabela 4 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, em diferentes temperaturas, em tampão acetato pH 5,0 50 mM utilizando sabugo de milho 1% como fonte de carbono a 30 °C com agitação.	14

1.0 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas altamente especializadas na catálise de reações biológicas, elas apresentam uma extraordinária eficiência catalítica, em geral, muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Além dessas características elas possuem um alto grau de especificidade por seus substratos e funcionam em soluções aquosas sob condições muito suaves de pH e temperatura. (NELSON; COX, 2011, p.183)

Por conta de suas propriedades, o uso de enzimas como catalisadores de processos industriais vêm sendo cada vez mais utilizado, pois é de fundamental importância para obtenção de produtos de maior valor agregado, por tecnologias limpas, em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e de preservação ambiental.

Utilizando do conceito de tecnologias limpas o uso de biomassa residual como substrato para novas pesquisas, pois restos de processos industriais estão sendo reaproveitados e o que antes viraria lixo se transforma em produtos com alto valor de mercado. Essas matérias-primas podem ser amiláceas e lignocelulósicas. As lignocelulósicas são composta por três estruturas básicas lignina, celulose e hemicelulose que são a parte do vegetal que forma a parede celular correspondendo a cerca de 50% da biomassa terrestre sendo, assim os compostos mais abundantes na biosfera.(BON; FERRARA; CORVO, 2008)

A hemicelulose é um complexo de carboidratos poliméricos xilanos, xiloglucanos, glucomanas, galactoglucomanas e arabinogalactanas Xilana é o maior polissacarídeo estrutural das plantas e o segundo polissacarídeo natural mais abundante (COLLINS et al., 2005).

A xilana é encontrada em diferentes tipos de vegetais, como em madeiras duras de angiosperma (15 – 30% da parede celular), madeiras macias de gimnosperma (7 – 10%) e em plantas anuais (inferior a 30%). Sua estrutura básica é composta principalmente por resíduos D-xilopiranosícos unidos por ligações do tipo β -1,4. Normalmente esta cadeia linear apresenta cadeias laterais que podem ser resíduos acetil, 4-O-metil-D-Glucuronosil e/ou L-arabinofuranosil, cuja composição e ocorrência dependem da origem do xilano. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

Para hidrólise completa da xilana uma série de enzimas xilanolíticas estão envolvidas na clivagem das cadeias principais e laterais, por conta da complexidade desse polímero, essas enzimas são denominadas xilanases (enzimas degradadora de xilano). As principais xilanases são endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal do xilano liberando xilooligossacarídeos e as β -D-xilosidases (EC 3.2.1.55), que clivam xilobiose e xilooligossacarídeos a xilose a partir das extremidades não redutoras. (COLLINS et al., 2005)

Xilanases são encontradas em algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos, caracóis e sementes de plantas terrestres. Entre origem microbiana, os fungos filamentosos são especialmente interessantes como eles secretam estas enzimas para o meio e seus níveis de xilanase são muito superiores aos encontrados em leveduras e bactérias.(POLIZELI et al., 2005)

Enzimas xilanolíticas têm um alto valor comercial, pois são utilizadas nos mais variados processos industriais como: Indústria de bebidas (na clarificação de sucos, redução da

viscosidade), Indústria de ração animal (principalmente de ruminantes quebrando polissacarídeos facilitando assim sua digestão), Indústria de papel (atua no branqueamento da polpa de papel eliminando o tratamento com ácido clorídrico), Indústria de combustíveis (no processo de conversão de xilano em xilose ou xilulose para posterior fermentação alcoólica) entre outros.(BON; FERRARA; CORVO, 2008; COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

O estudo de micro-organismos isolados da Amazônia como fonte de novas tecnologias é essencial para obtenção de sistemas enzimáticos com aplicações biotecnológicas. O fato da biodiversidade ainda ser pouco explorada nos dá uma vantagem em relação a outros países por conta da disponibilidade.

Por conta das suas aplicações o estudo da produção dessas enzimas através matérias-primas renováveis é uma solução economicamente viável, pois valoriza os resíduos industriais e aplicados regionalmente pode gerar renda. Um exemplo é a produção de álcool de segunda geração através do bagaço de cana-de-açúcar onde uma mistura de enzimas como amilases e xilanases biotransforma um resíduo que antes serviria para abastecer energeticamente, através da sua queima, as usinas em álcool um produto com um valor agregado maior.

O presente tem como objetivo estudar a produção de xilanases por fungo filamentosos isolado de solo Amazônico através da fermentação em meio líquido utilizando como substrato Farelo de Trigo, Farelo de Aveia, Farinha de Batata Doce, Sabugo de Milho. Manter a linhagem fúngica, determinar o melhor substrato, tempo e modo de cultivo, pH e temperatura ótima indutor para a produção do complexo xilanolítico e caracterizar parcialmente o complexo enzimático.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Interesse biotecnológico em enzimas

A utilização de produtos biotecnológicos, especialmente proteínas e enzimas, no setor industrial, vêm aumentando significativamente em nível mundial. O mercado de enzimas brasileiro foi avaliado em U\$ 147,2 mi (3,7% do mercado internacional) dos quais 86% (U\$ 126,6 mi) são importadas e 14% (U\$ 20,6 mi) são de exportação. Assim inúmeros esforços foram realizados no sentido de aperfeiçoar seus processos de produção de forma a se obter melhores rendimentos e valores de produtividade mais elevados. Nesse contexto a utilização de microrganismos na produção de complexos proteicos apresenta-se consideravelmente interesse biotecnológico na aplicação em bioprocessos ou para ser otimizadas na tentativa de produtos com melhores qualidades (BON; FERRARA; CORVO, 2008; COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005).

2.2 Xilana

A xilana é uma importante estrutura de polissacarídeos nas células vegetais e é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, representando cerca de um terço de todo o carbono orgânico renovável da terra. A Xilana é o principal componente da hemicelulose, um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xiloglucano, glucomanano, galactoglucomanano e arabinogalactana que juntamente com a celulose e lignina compõem os principais constituintes poliméricos de células da parede vegetal (COLLINS et al., 2005).

Xilana é encontrado em grandes quantidades a partir de madeiras duras de angiospermas (15-30% do conteúdo da parede celular) e a partir de madeira macia de gimnospermas (7-10%), bem como em plantas anuais (<30%) (COLLINS et al., 2005).

2.3 Enzimas xilanolíticas

Xilanases são enzimas que hidrolisam a xilana. Estas enzimas são produzidas principalmente por microorganismos. As xilanases também podem ser produzidas por algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos, caracóis e sementes de plantas terrestres. Entre origem microbiana, os fungos filamentosos são especialmente interessantes como eles secretam estas enzimas para o meio e seus níveis de xilanases são muito superiores aos encontrados em leveduras e bactérias (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005).

Devido à sua estrutura heterogênea, a degradação completa do xilano necessita não apenas de uma enzima, mas um complexo enzimático. Estas enzimas estão presentes em fungos e bactérias, mas até agora poucos foram purificados e analisados em termos das suas propriedades

físicas e químicas. As xilanases podem ser endo-1,4- β -xilanase (xilanohidrolase 1,4- β -D-xilana; EC 3.2.1.8) que clivam ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana, provocando uma redução no grau de polimerização do substrato. Xilana não é atacada de forma aleatória, mas as ligações selecionadas para a hidrólise depende da natureza da molécula do substrato, ou seja, o comprimento da cadeia, o grau de ramificação, e da presença de substituintes. Inicialmente, os principais produtos da hidrólise são oligômeros β -D-xilopiranosil, mas numa fase posterior, as moléculas pequenas, tais como monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos de β -D-xilopyranosil podem ser produzidas, as acetilxilana esterase remove grupos *O*-acetil da posição 2 e/ou 3 do resíduos de β -D-xilopyranosil. A arabinase remove resíduos L-arabinose substituídos nas posições 2 e 3 da β -D-xilopyranosil. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

2.4 Produção industrial de xilanases

Xilanases podem ser produzidas industrialmente em fermentações líquidas, sólidas ou semi-sólidas, mas cerca de 80-90% de todas as xilanases são produzidas em cultura submersa. Substratos alternativos para produção de enzimas também têm sido relatadas, tais como bagaço de cana, casca de arroz e polpa de madeira. Na cultura líquida, a xilanase é produzida em resposta à xilanas de várias fontes. resíduos de β -D-Xilopiranosil pode atuar como um indutor do complexo xilanolítico. Outro composto frequentemente utilizado como um potente indutor é β -metil xiloside, um análogo não metabolizável estrutural da xilobiose que podem ser feitos com baixo custo. (POLIZELI et al., 2005)

2.5 Aplicações industriais de xilanases

Xilanase começou a ser usado na década de 1980: inicialmente na preparação de rações para animais e, posteriormente, nas indústrias têxteis, alimentos e papel. Atualmente xilanase e celulase, em conjunto com pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial de enzimas. (POLIZELI et al., 2005)

2.5.1 Xilanases na composição de ração animal

A utilização de enzimas na produção de alimentos é um importante setor do agronegócio, com uma produção mundial anual superior a 600 milhões de toneladas e um volume de negócios superior a 50 bilhões de dólares (POLIZELI et al., 2005). Xilanases são utilizados na alimentação animal, juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases. Essas enzimas quebram arabinoxilanos nos ingredientes da ração, reduzindo a viscosidade das matérias-primas. O arabinoxilano encontrados nas paredes celulares dos grãos tem um efeito anti-nutricionais em aves. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

Quando o arabinosilano está presente na forma solúvel, pode aumentar a viscosidade do alimento ingerido, interferindo na mobilidade e de absorção de outros componentes. Se xilanases forem adicionadas à ração contendo milho e sorgo, sendo que ambos são alimentos de baixa viscosidade, pode melhorar a digestão de nutrientes na parte inicial do tubo digestivo, resultando em uma melhor utilização da energia. A ação conjunta do resto das enzimas acima produz uma mistura de alimentos mais digeríveis. Aves e suínos jovens produzem enzimas endógenas em quantidades menores do que os adultos, de modo que suplementos alimentares que contenham enzimas exógenas deve melhorar o seu desempenho. Além disso, este tipo de dieta é recomendada para reduzir os resíduos indesejados nas excreções (fósforo, nitrogênio, cobre e zinco), um efeito que poderia ter um papel na redução da contaminação ambiental. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

2.5.2 Indústria alimentícia, pão e bebidas

Xilanases podem ser empregadas na fabricação de pão, juntamente com α -amilase, glicose oxidase e proteases. As xilanases quebram a hemicelulose presente na farinha de trigo, ajudando na redistribuição de água e deixando a massa mais macia e mais fácil de amassar. Com o uso de xilanases tem havido um aumento nos volumes de pão, pois a enzima propicia uma maior absorção de água e maior resistência à fermentação. Além disso, uma quantidade maior de arabinosilooligosacarídeos no pão seria benéfica para a saúde. Na fabricação de biscoitos a xilanase é recomendada para confecção de bolachas cream mais leve além de melhorar a textura, palatabilidade e uniformidade das lâminas. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

As indústrias de suco e vinho formam uma boa parte do mercado de enzimas. A produção de sucos de frutas e produtos hortícolas requer métodos de clarificação, extração e estabilização. Na década de 1930, quando a fabricação de sucos de frutas cítricas começou, os rendimentos foram baixos e problemas foram encontrados na filtração do suco, devido à sua turbidez. O aumento no conhecimento dos constituintes químicos dos frutos e o uso de enzimas ajudaram a resolver estes problemas. Hoje em dia, as xilanases, em conjunto com celulasas, amilases e pectinases, levam a um melhor rendimento de suco por meio de liquefação de frutas e legumes; estabilização da polpa do fruto, aumento da recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, corantes comestíveis, pigmentos, etc. Na redução da viscosidade, a hidrólise de substâncias que impedem a compensação física ou química do suco, ou que possam causar nebulosidade no concentrado. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

Xilanase, em combinação com endoglucanase, participa da hidrólise do amido e arabinosilano para separar e isolar o glúten da fécula na farinha de trigo. Esta enzima também é usada em grãos de café. As principais características desejáveis para xilanases para uso na indústria de alimentos são alta estabilidade e atividade ótima em pH ácido. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

2.5.3 Indústria Têxtil

O complexo xilanolítico pode ser usado na indústria têxtil para o processamento de fibras vegetais, como juta ou linho. Para este efeito, a xilanase deve ser livre de enzimas celulolíticas. Por exemplo, o processo consiste em incubar hastes de capim da China com xilanase para liberar

fibras longas de celulose intactas. Depois de usar esse método, não há necessidade de utilizar a etapa de branqueamento forte, uma vez que a lignina não sofre oxidação, o que levaria ao escurecimento das fibras. Relativamente pouca pesquisa tem sido feita sobre a preparação enzimática de fibras têxteis, e, no entanto este parece ser um mercado promissor, exigindo o desenvolvimento de novas técnicas. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

As xilanases também é empregada em outros setores da indústria como na indústria farmacêutica, química, papel e celulose e etc. levando em consideração o estudo de novas vias metabólicas para produção dessa enzima de alto valor comercial. (COLLINS et al., 2005; POLIZELI et al., 2005)

3.0 METODOLOGIA

3.1 Linhagem, cultivo e manutenção

Para o desenvolvimento desse estudo utilizou-se uma linhagem de fungo filamentososo de solo Amazônico isolado em trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa do laboratório onde este projeto foi desenvolvido. Os fungos foram cultivados em meio Sabouraud, BDA e Malte na BOD por 7 dias a 32 °C. O melhor meio indutor de esporos foi selecionado e foi preservado em água destilada e deionizada e glicerol 50% onde posteriormente foi utilizado como fonte de esporos para os demais repiques. A suspensão de conídeos foi feita em água destilada autoclavada, contendo 10^7 esporo/mL que foram inoculadas em meio líquido de Vogel (1956).

3.2 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pelo método descrito por Miller (1959) onde uma alíquota de 25 µL de uma solução de 1% de xilano de birchwod (m/v) em tampão fosfato 50 mM pH 6,0, foi utilizada na qual adicionou-se 25 µL do tampão utilizado no substrato mais 25 µL do filtrado bruto de complexo enzimático incubou-se em banho maria a uma temperatura de 50 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 125 µL de ADNS e posteriormente submetida a um banho fervente por 5 minutos. As amostras foram diluídas com 1,25 mL de água destilada e submetidas a leituras espectrofotométricas a um comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como correspondendo à liberação de 1 µmol de açúcar redutor equivalente a xilose, por minuto por mL de amostras nas condições de ensaio. As atividades específicas foram expressas em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando brancos apropriados.

3.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) onde 15 µL da amostra foram colocados em um micro tubo de 1,5 mL adicionado de 18,4 µL de água destilada e 266,6 µL do reagente de Bradford SIGMA esperou por 5 minutos no escuro e as amostras foram submetidas a leituras espectrofotométricas a 595 nm. O branco foi preparado substituindo a enzimas por água destilada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Influência da fonte de carbono, tempo e modo de cultivo na produção do complexo xilanolítico excretado por fungo isolado do solo Amazônico.

A linhagem fúngica foi cultivada em meio líquido de Vogel (1956) na condição estacionária em BOD a 30 °C e sob agitação a 150 rpm, 30 °C sob diferentes fontes de carbono.

Utilizou-se como fontes de carbono Farelo de Trigo, Farelo de Aveia, Farinha de Batata Doce, Sabugo de Milho e Bagaço de Cana com o intuito de determinar a melhor indutora excretada pelo referido fungo de xilanase. Retirou-se a cada 24 horas uma fração de 1,5 mL de caldo enzimático para posterior dosagem enzimática determinando a cinética de produção. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 Determinação do melhor pH e temperatura de produção do complexo xilanolítico.

Depois de selecionado o melhor substrato, modo e tempo de cultivo fez-se a determinação do melhor pH inicial de produção do complexo enzimático. A influência desse parâmetro foi avaliada no intervalo de 3,0 a 8,0 (intervalo de 0,5 unidades) em meio líquido utilizando tampão acetato 50 mM para o intervalo de 3,0 a 5,5, tampão fosfato de sódio 50 mM para o intervalo de 6,0 a 8,0.

A avaliação da temperatura de produção do complexo xilanolítico excretado pelo referido fungo foi realizada nas temperaturas de 25, 30 e 40 °C com as condições previamente estudadas tipo de substrato, modo de cultivo, tempo de produção e pH inicial. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade xilanólica determinada de acordo com os procedimentos supracitados no item 3.2.

3.6 Caracterização parcial do complexo enzimático excretado pelo fungo filamentoso

3.6.1 Determinação do pH e temperatura ótima do complexo xilanolítico.

Dilui-se o xilano de birchwood em tampão MacIlvaine 50 mM na faixa de pH de 3,0 a 8,0 (em intervalos de 0,5 unidade) e realizou as dosagens enzimáticas com o complexo enzimático produzido nas condições previamente determinadas seguindo o protocolo descrito no item 3.2.

Após definir o pH ótimo determinou-se a temperatura ótima onde variou-se a temperaturas do ensaio de atividade enzimática (item 3.2) que foram 5, 22, 36, 45, 55, 65 e 75 °C (SILVA, L.A.O, CARMONA, E.C., 2008)

3.6.2 Estabilidade do complexo xilanolítico a diferentes temperaturas e pHs.

A estabilidade térmica foi avaliada através da incubação do extrato enzimático á 50, 65 e 75 °C por 5, 10, 20, 30, 60 min na ausência de substrato. Após cada período, foram retiradas amostras para determinação da atividade xilanase residual, conforme descrito no item 3.2.

A determinação da estabilidade ao pH foi realizada incubando o extrato enzimático previamente diluído em diferentes tampões na proporção de 1:1 (v/v), utilizando-se tampão

McIlvaine para valores de pH 3,0 a 8,0. Após 24h de incubação da mistura a 25 °C foi determinada a atividade xilanase residual, conforme descrito no item 3.2. (SILVA, L.A.O, CARMONA, E.C., 2008).

3.6.3 Afinidade por diferentes substratos

A atividade xilanolítica do complexo enzimático foi realizada conforme a metodologia descrita no item 3.2., utilizando-se como substratos xilano de aveia, xilano de birchwood, avicel, carboximetilcelulose e celobiose.

3.6.4 Parâmetro cinéticos

O efeito da variação do substrato, xilano de birchwood, de 1,0 a 100,0 mg/ml na atividade de xilanase foi avaliada sob as condições de ensaio ideal (definidas anteriormente). Os parâmetros cinéticos de K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{máx}$ foram estimados por regressão linear de duplo recíproco de acordo com Lineweaver e Burk.

3.7 Tratamento de dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos serão apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas será assumida o valor de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após inoculado o fungo, que encontrava-se preservado em água deionizada e autoclavada nos meios de cultivo BDA, Malte e Saboroud (cuja formulações encontram-se no Anexo) incubou-se BOD por 7 dias a 32 °C com observação diária constatou-se que o meio Saboroud foi o que melhor induziu a formação de esporos. O meio de cultivo Saboroud é completo, ou seja, contém todas as fontes nutricionais para que um micro-organismo cresça, portanto selecionou-o para preservação da linhagem fúngica e posteriores repiques.

A preservação da linhagem fúngica XSCM 1 *Aspergillus sp.* foi realizada por repiques em água destilada, deionizada e autoclavada em quintuplicata, ou seja, com cinco repetições e em glicerina 50% em triplicata, com três repetições e armazenadas na coleção do Laboratório de Fermentação.

Avaliou-se as fontes de carbono indutoras de xilanase em meio líquido sem agitação e todas as fontes estudadas mostraram-se capaz de produzir o complexo enzimático em questão, mas o sabugo de milho obteve um resultado superior aos demais (Figura 1).

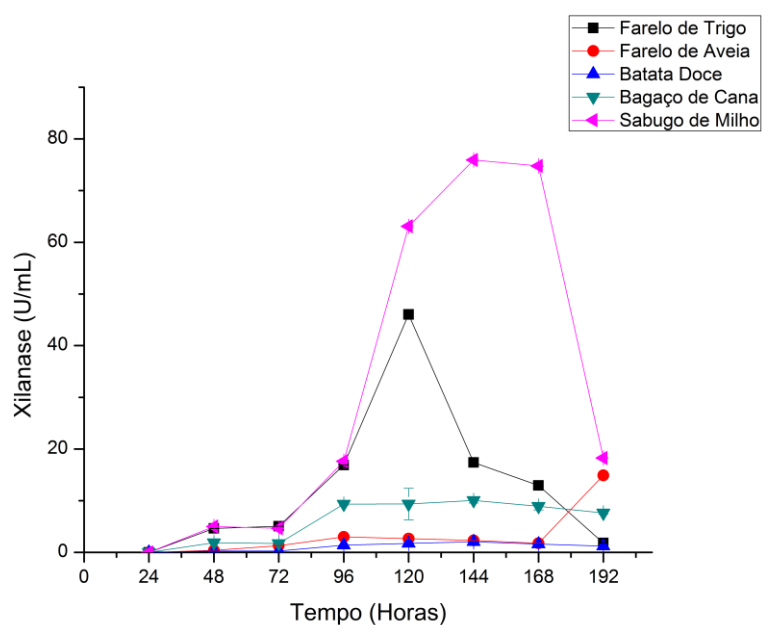


Figura 1 – Produção do complexo xilanolítico em meio líquido de Vogel do conteúdo diferentes fontes de carbono a 30 °C em condição estacionária.

Os valores dos picos e o tempo de cultivo em horas bem como as atividades específicas (atividade específica é a razão entre a atividade enzimática e a atividade de proteínas) de cada fonte de carbono estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, nos picos de produção em diferentes fontes de carbono 32 °C sem agitação.

Fonte de Carbono	Tempo de Cultivo (Horas)	Atividade Enzimática (U / mL)	Atividade Específica (U / mg)
Sabugo de Milho	144	75,9291	860,2574
Bagaço de Cana	144	10,05496	232,6057
Batata Doce	120	1,74952	30,8069
Farelo de Aveia	192	14,91226	194,4134
Farelo de Trigo	120	46,02824	5531,9360

A produção máxima de xilanase em condição estacionária obtida foi em 120 h para Farinha de batata doce e Farelo de trigo, 144 h para sabugo de milho e bagaço de cana e 192 h para farelo de aveia, como mostra a tabela 1, onde todos os resíduos agrícolas utilizados como substrato obteve um resultado significativamente superior ao que descrito por Silva (2008), que utilizou *Trichodrema inhamatum* para produzir xilanase nos mesmos resíduos utilizado nesse trabalho mostrando que o microrganismo usado é um bom degradador de xilano de resíduos.

Para prosseguir com os estudos em modo agitado foram selecionadas as três melhores fontes de carbono para a produção do referido complexo xilanolítico, ou seja, sabugo de milho, bagaço de cana e farelo de trigo. A atividade enzimática do sabugo de milho pode ser explicada por conta da alta concentração de resíduos de hemicelulose na sua estrutura cerca de 14,8% . O bagaço de cana possui em sua composição 23,3% de hemicelulose, uma quantidade superior ao sabugo, no entanto é necessário um pré-tratamento da matéria-prima o que seria mais um custo, industrialmente falando, e o produto não é de origem regional, outrora que o sabugo de milho utilizado nesse trabalho é da região adquirido na feira do mercado municipal de Manaus. Os valores para o farelo de trigo não foram informados, mas na palha de trigo contém 19,2% de hemicelulose (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

O ensaio em modo agitado procedeu da mesma forma que o de modo sem agitação, utilizando 1% da fonte de carbono em meio líquido de Vogel por 216 horas. Observou-se que todas as fontes de carbono melhoraram suas atividades determinando que o modo agitado é o melhor para produção de xilanase, ou seja, o microrganismo necessita de uma maior aeração do meio para excretar mais enzima, já que com a agitação ele tem mais contato com o substrato.

A melhor fonte de carbono foi o sabugo de milho com uma atividade enzimática superior aos demais como podemos detectar na Figura 2. Os valores de tempo de cultivo, atividade enzimática e atividade específica dos três substratos estudados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de atividades xilanolítica U/mL e atividade e xilanase específica em U/mg de proteínas, nos picos de produção em diferentes fontes de carbono a 30 °C sob agitação de 150 rpm.

Fonte de Carbono	Tempo de Cultivo (Horas)	Atividade Enzimática (U / mL)	Atividade Específica (U / mg)
Sabugo de Milho	144	497,181± 5,5937	5932,971748
Bagaço de Cana	120	230,459 ± 7,9055	4423,633754
Farelo de Trigo	96	115,659± 5,0901	1453,640913

Para determinar o pH inicial de produção selecionou-se a fonte de carbono com melhor atividade enzimática no melhor tempo de produção, ou seja sabugo de milho, porém 144 horas é um tempo de cultivo demasiadamente longo e por problemas de estrutura (falta constante de energia e agendamento do uso do equipamento de rotação) não foi possível trabalhar com o pico de produção, pois não conseguia-se manter o equipamento funcionando pelo tempo determinado, por conta disso o tempo de cultivo foi em 96 horas que apresentou uma atividade enzimática de 403,662 U/mL e atividade específica de 5346,358479 U/mg.

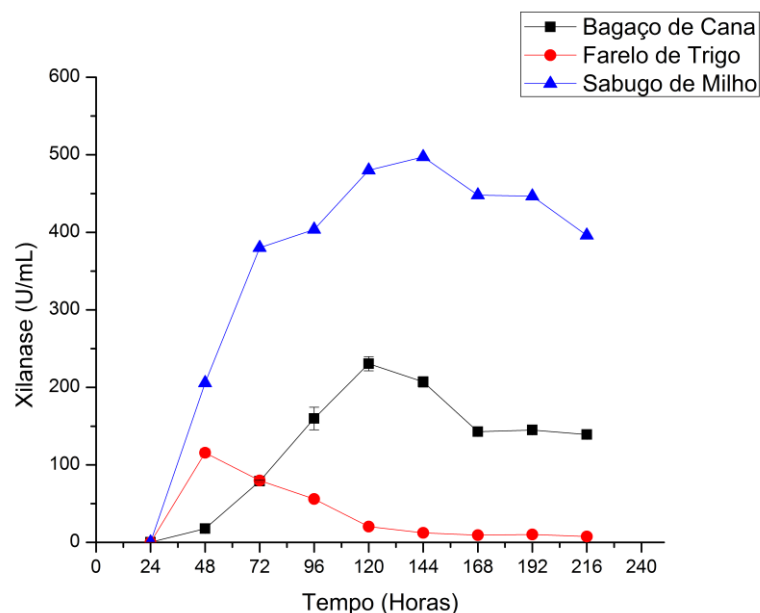


Figura 2 – Produção do complexo xilanolítico em meio líquido de Vogel sob agitação de 150 rpm com diferentes fontes de carbono

A avaliação do pH inicial de produção foi determinada através de parâmetro previamente estabelecidos, como melhor substrato, tempo e modo de cultivo, ou seja, sabugo de milho em modo agitado sob 150 rpm, a 30 °C por 96 horas em meio líquido de Vogel substituindo a água pelo tampão com o pH inicial correspondente. A Figura 3 ilustra a variação de atividade de xilanase em relação ao pH e a Tabela 3 o valor da atividade específica no pico de produção.

Observou-se uma diminuição considerável na atividade enzimática alguns fatores podem ser considerados para o fato que são: a mudança do substrato que é um sabugo de milho de safra diferente podendo não ter as mesmas condições, os tampões utilizados que podem estar interferindo no crescimento do fungo e/ou na produção das enzimas ou até mesmo o microorganismo que parou de produzir a enzima em grande quantidade, por conta da sua adaptação ao estoque.

Os ensaios de temperatura ótima de produção foram realizados com as condições otimizadas anteriormente onde a temperatura de 30 °C foi a que teve o melhor resultado conforme mostra a Figura 4. Os valores de atividade enzimática e atividade específica estão contidos na Tabela 4.

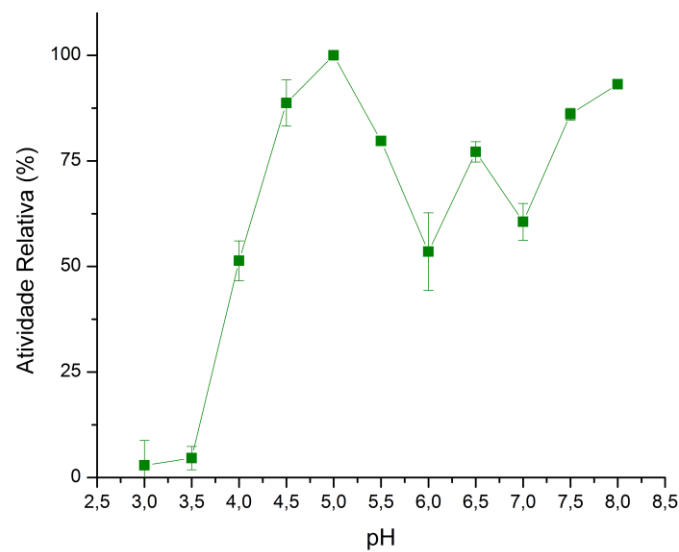


Figura 3 - Gráfico da determinação do pH ótimo de produção utilizando sabugo de milho como fonte de carbono. Utilizou-se tampão acetato nos pH's de 3,0 a 5,5 e tampão fosfato nos pH's de 6,0 a 8,0.

Tabela 3 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, em tampão acetato pH 5,0 50 mM utilizando sabugo de milho 1% como fonte de carbono a 30 °C com agitação.

pH	Atividade Enzimática (U / mL)	Atividade Específica (U / mg)
5,0	58,1423± 0,41403	137,576

Os ensaios de temperatura ótima de produção foram realizados com as condições otimizadas anteriormente onde a temperatura de 30 °C foi a que teve o melhor resultado conforme mostra a Figura 4. Os valores de atividade enzimática e atividade específica estão contidos na Tabela 4.

O efeito da temperatura na produção de xilanase, conforme observado na Figura 4 e Tabela 1 foi de 30 °C tendo uma atividade enzimática e atividade específica de 68,4767 U/mL e 95,92214 U/mg Silva (2008) obteve um pico de atividade de 244,02 U/mL e 120,62 U/mg para *T. inhamatum* a 25 °C pH 6,0 utilizando xilano de aveia como substrato e meio líquido de Vogel e Coelho (2003) um pico de 57 U/mL para *Aspergillus giganteus* a 25 °C, pH 6,5 e o mesmo substrato e meio de cultivo que Silva. Shah (2005) obteve uma atividade de 29,0 U/mL para *Aspergillus foetidus* a 30 °C, sob agitação, em fermentação submersa utilizando sabugo de milho (2%) como substrato.

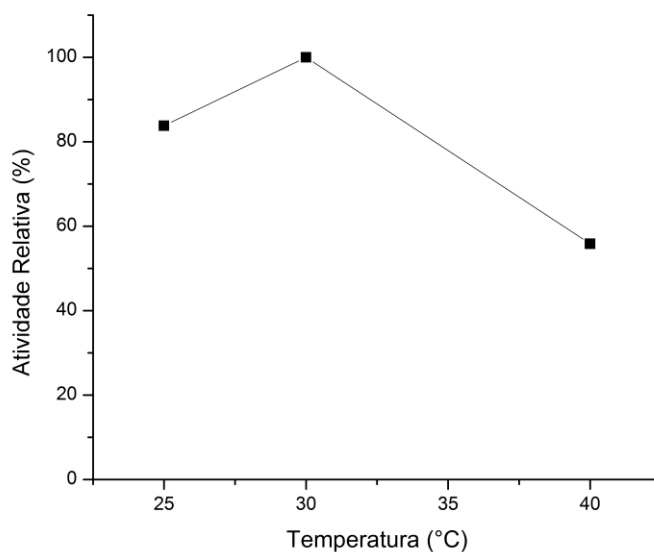


Figura 4 - Avaliação da produção de xilanase em diferentes temperaturas nas condições de cultivo previamente determinadas.

Tabela 4 - Valores de atividades enzimática e atividade específica, U/mL e U/mg respectivamente, em diferentes temperaturas, em tampão acetato pH 5,0 50 mM utilizando sabugo de milho 1% como fonte de carbono a 30 °C com agitação.

Temperatura	Atividade	
	Enzimática (U / mL)	Específica (U / mg)
25	57,3811±0,002	142,4102
30	68,4767±0,016	95,92214
40	38,2345±0,021	59,52493

A caracterização parcial do complexo xilanolítico quanto ao pH ótimo de atuação está ilustrado na Figura 5, onde pode-se detectar um pico de atividade no pH 5,5 conforme mostra a Figura 6 e a temperatura ótima de atuação do complexo estar presente na Figura 6 onde o máximo de atividade detectada foi na temperatura de 65 °C.

Polizeli (2005) apresenta em sua revisão uma tabela com as características de xilanases excretadas por vários microrganismos podendo observar que a classe de fungo *Aspergillus* é um excelente produtor de enzimas xilanolíticas e que os valores de pH e temperatura ótima são condizentes com outros trabalhos publicados ao redor do mundo, esse trabalho afirma que a principal enzima xilanolítica atuante nesse complexo pode ser a endoxilanase, pois é característica dela o pico de atividade ser entre pH 4,0 e 6,5 e temperatura entre 40 e 80 °C.

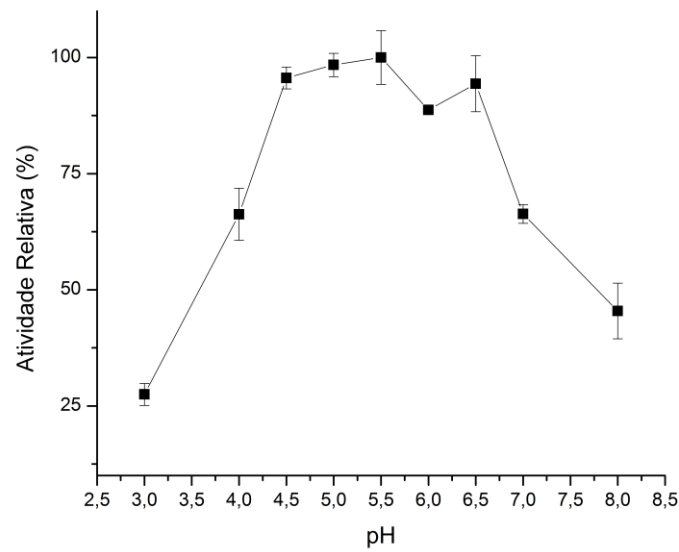


Figura 5 - pH ótimo de atuação da xilanase excretada por *Aspergillus sp.*

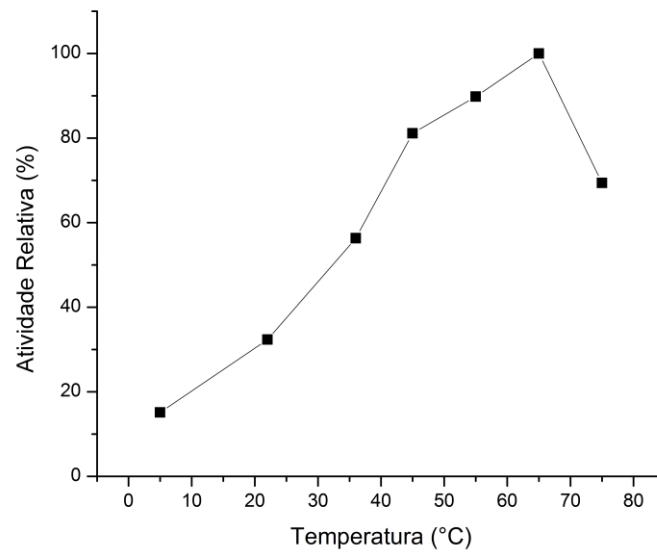


Figura 6 - Temperatura ótima de atuação da xilanase excretada por *Aspergillus sp.*

O estudo da estabilidade do complexo é importante para determinar o quão resistente é sua enzima para podê-la adequá-la ao processo industrial em que poderá sê-la empregada. A atividade enzimática é afetada pelo pH da solução, pois a distribuição das cargas no substrato e nas moléculas de enzimas, em partículas. A faixa de pH favorável para o microrganismo em estudo é de 4,0 a 6,5 com uma queda significativa no pH 6,0 conforme mostra a Figura 7.

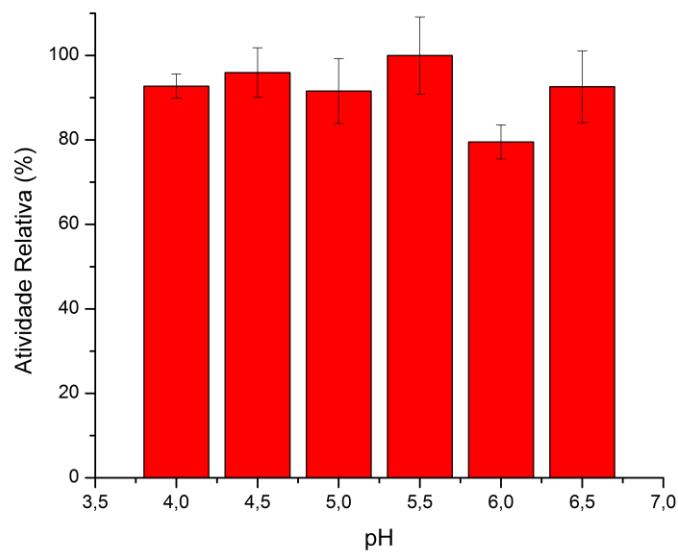


Figura 7 - Influência do pH na estabilidade (24 h, 26 °C) do complexo enzimático excretado por *Aspergillus sp.*

Um dos problemas industriais é a inativação das enzimas por meio da mudança de temperatura. Uma enzima com uma faixa de estabilidade térmica muito alta pode ser prejudicial ao processo. Nesse trabalho a estabilidade térmica do complexo se deu a 50 °C após 60 minutos ainda matinha uma atividade residual de 74% em relação ao início. A 65 °C houve uma queda brusca após 5 minutos (3% da atividade residual) e a 75 °C o mesmo foi observado houve uma queda brusca (5% da atividade residual).conforme mostra a Figura 8.

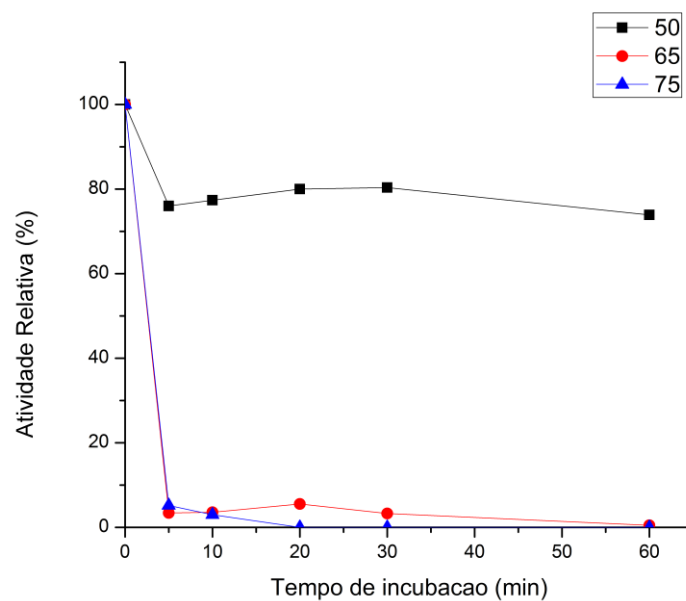


Figura 8 - Estabilidade térmica do complexo xilanólítico de *Aspergillus sp.*

As reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento de substrato. Se a velocidade inicial da reação é medida sobre uma escala de concentrações de substrato $[S]$, a velocidade de reação aumenta com o acréscimo de $[S]$. Entretanto, à medida que a $[S]$ aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atinge o valor máximo.

Os valores de K_m sofrem uma regressão linear para deixar o gráfico linear, já que o gráfico original gerado é uma hipérbole. Para se tornar linear usa-se a representação gráfica de Lineweaver-Burke, ou duplo recíproco, onde tomam os valores postados no gráfico original inversos resultando em uma linha reta cuja interseção da reta com o eixo y representa $1/V_0$ e a interseção com o eixo x representa $-1/K_m$. O gráfico do K_m e $V_{máx}$ está disposto abaixo juntamente com o gráfico de Lineweaver-Burke conforme as Figuras 9 e 10.

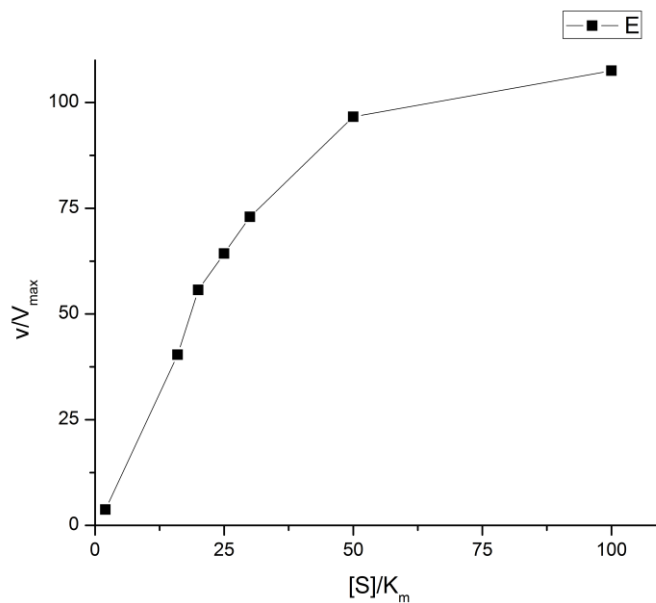


Figura 9 - Curva de saturação de xilanase utilizando xilana de birchwood como substrato.

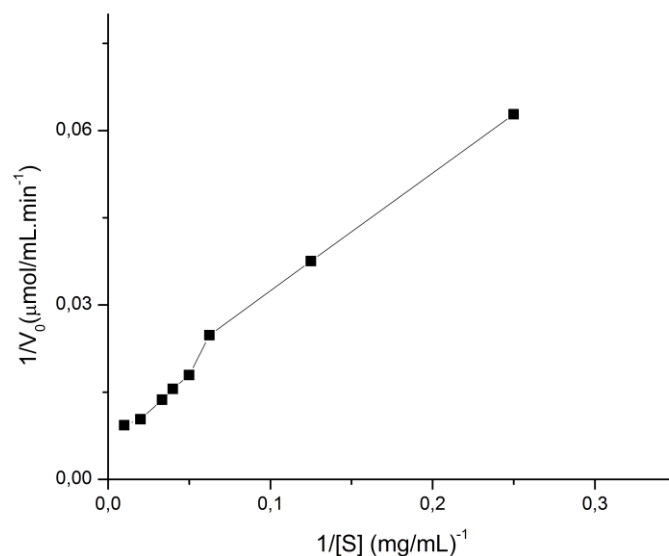


Figura 10 - Gráfico de Lineweaver-Burke para xilanase excretada por *Aspergillus sp.*

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para o complexo enzimático foram 138,88 mg/mL e 31,64 U/mL, respectivamente, mostrando que o complexo enzimático não tem muita afinidade pelo substrato, já que no complexo enzimático existem várias enzimas diferentes com mecanismos de ação distinto atuando ao mesmo tempo. Para que se tenha um resultado de K_m onde a enzima seja mais afim é necessário realizar a purificação do principal componente xilanolítico desse complexo.

5.0 CONCLUSÃO

O trabalho aqui apresentado mostrou que matérias-primas renováveis podem e devem ser utilizadas como fontes de carbono para produção de xilanase, um produto ainda oriundo da tecnologia limpa e com aplicações biotecnológicas. A definição de parâmetros para melhor produção dos complexos enzimáticos são fatores determinantes para que se possa dizer qual a melhor aplicação industrial.

O fungo filamentososo estudado foi isolado de solo na cidade de Manaus e mostrou-se altamente capaz de produzir xilanases. Nas condições avaliadas no presente trabalho o sabugo de milho, uma matéria prima que, em geral, tem como destino o lixo foi aproveitada e mostrou-se a melhor fonte indutora de xilanase no modo agitado 150 rpm, a um pH de 5,5 e temperatura de 30 °C definindo, assim, as melhores condições de cultivo.

A caracterização parcial do complexo enzimático nos mostrou que essa enzima um alto potencial para ser aplicado na indústria, pois possui uma boa estabilidade quanto a pH mantendo-se estável na faixa de 3,0 a 6,5 e uma estabilidade térmica bem definida a 50 °C que pode permitir sua inativação rapidamente aumentando a temperatura.

Com esse estudo podemos deixar de dizer que a biodiversidade amazônica tem potencial para produção de complexos enzimáticos com aplicação industrial para afirmar e até mesmo investi nesse setor que vem crescendo cada vez mais e assim transformar o Amazonas em um pólo da indústria de enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BON, E. P. S; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. 2008. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. V. 72, p.248-254. 1976;

COELHO G. D; CARMONA, E. C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p.269-277, 2003

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.29, p.3-23, 2005.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Amsterdam, v.31, p.426-428, 1959.

NELSON, David L; COX, Michael M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. Tradução: Fabiana Horn. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 183 p.

POLIZELI, M. L. T. M; RIZZATI, A. C. S; MONTI, R; TERENCE, H. F; JORGE, J. A; AMORIN, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol.**, Berlin, v.67, p.577-591, 2005.

SHAH, A. R; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1763-1771, 2005

SILVA, L. A. O; CARMONA, E. C. Production, and Characterization of Cellulase-free xylanase from *Trichoderma inhamatum*. **Appl Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p.117-125, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microb. Genet. Bull**, Columbus, v. 13, p.42-43, 1956.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Descrição	Ago 201 0	Set	Out	Nov	Dez	Jan 201 1	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão de Literatura.	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR
Tratamento da matéria-prima.												
Adaptação da metodologia.		AR										
Linhagem, Cultivo e Manutenção.	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR			
Determinar o melhor substrato indutor para a produção de xilanases pelo referido fungo; Ensaio de Laboratório.			AR	AR								
Determinar o melhor tempo e modo de cultivo.				AR	AR							
Determinar pH e temperatura ótima de produção.					AR	AR	AR					
Caracterização o complexo enzimática, determinação do pH e temperatura ótima								AR				
Caracterização o complexo enzimática, estabilidade térmica e em diferentes pHs									AR			
Caracterização o complexo enzimática, afinidade em diferentes substratos.										AR		
Análise de dados	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	AR	
Preparação do relatório e apresentação final.											AR	AR

Legenda: AR – Atividade Realizada

APÊNDICE

Meio Sabouraud

Glicose	4,0 g
Peptona	2,0 g
Agar	2,0 g
Água destilada	200 mL

Meio BDA

Batata limpa e descascada	40,0 g
Dextrose	4,0 g
Agar	3,0 g
Água destilada	200 mL

Meio Agar Malte

Malte	4,0 g
Agar	3,0 g
Água destilada	200 mL

Meio Líquido de Vogel (1956)

Solução de elementos traços:

Ácido cítrico.H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ .6H ₂ O	1,00 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Água destilada qsp	100 mL

A solução de sais de Vogel foi preparada pela dissolução dos sais abaixo relacionados:

Citrato de sódio.5H ₂ O	15,0 g
KH_2PO_4	25,0 g
NH_4NO_3	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Solução de biotina (0,1mg/mL)	0,5 mL
Solução de elementos traços	0,5 mL
Água destilada qsp	100 mL