

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

**Seleção de microrganismo
para produção de
xilanases em bagaço de
cana-de-açúcar**

JUDITH LILIANA SOLÓRZANO LEMOS

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA

Luiz Inácio Lula da Silva

José Alencar Gomes da Silva

Vice-Presidente

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Sérgio Rezende

Ministro da Ciência e Tecnologia

Luís Manuel Rebelo Fernandes

Secretário Executivo

Avílio Franco

Secretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa

CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL

Adão Benvindo da Luz

Diretor do CETEM

Ronaldo Luiz Correa dos Santos

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

Zuleica Carmen Castilhos

Coordenador de Planejamento, Acompanhamento e Avaliação

João Alves Sampaio

Coordenador de Processos Minerais

Antônio Rodrigues de Campos

Coordenador de Apoio Tecnológico à Micro e Pequena Empresa

Arnaldo Alcover Neto

Coordenador de Análises Minerais

Cosme Antonio de Moraes Regly

Coordenador de Administração

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

ISSN 0103-7374

STA-35

Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar

JUDITH LILIANA SOLÓRZANO LEMOS

D.Sc. em Bioquímica pela UFRJ

ISBN 85-7227-234-8

CETEM / MCT

2006

SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

RICARDO MELAMED

Editor

LUIS GONZAGA SANTOS SOBRAL

Subeditor

CONSELHO EDITORIAL

Marisa Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio Moreira Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos Augusto da Costa (UERJ), Fátima Maria Zanon Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánchez (EPUSP), Virginia Sampaio Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minero-metalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo deste trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

JACKSON DE FIGUEIREDO NETO

Coordenação editorial

THATYANA PIMENTEL RODRIGO DE FREITAS

Revisão

ANA SOFIA MARIZ

Capa e editoração eletrônica

SUMÁRIO

RESUMO | ABSTRACT ▶ 6

1. INTRODUÇÃO ▶ 7

2. MICRORGANISMOS QUE DEGRADAM HEMICELULOSE ▶ 12

3. OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVA ▶ 20

3.1 Objetivos Específicos ▶ 20

4. MATERIAIS E MÉTODOS ▶ 21

4.1 Microorganismos ▶ 21

4.2 Pré-seleção em placas de Petri ▶ 22

4.3 Pré-seleção – Fermentação submersa (FS) ▶ 23

4.4 Metodologia Analítica ▶ 24

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ▶ 26

5.1 Pré-seleção ▶ 26

5.2 Seleção ▶ 29

5.3 Avaliação preliminar do caráter constitutivo e/ou indutivo de xilanases produzidas por *A. awamori* ▶ 36

6. CONCLUSÕES ▶ 41

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ▶ 42

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo abordar aspectos tecnológicos da produção de xilanases, tratando inicialmente da seleção de microrganismos (actinomicetos e fungos filamentosos) com capacidade para produção destas enzimas. Estes experimentos preliminares de seleção permitiram apontar *Aspergillus awamori* NRRL 3112 e *Aspergillus niger* como os microrganismos de maior potencial para a produção de xilanases com baixa atividade celulásica, sendo que *A. awamori* foi a linhagem que apresentou maior produtividade volumétrica máxima (75 U/LH) em endo-xilanase e capacidade para produzir quantidades de β -xilosidase ligeiramente superiores às de *A. niger*.

O bagaço de cana, finamente cominuído e sem tratamento prévio, foi capaz de sustentar o crescimento de *A. awamori* e induzir a produção de 2000 U/L de endo-xilanase e 1500 U/L de β -xilosidase.

Os resultados obtidos a partir das fermentações com açúcares simples permitiram evidenciar um aumento considerável no valor da atividade endo-xilanásica (4842 U/L em xilose, 4277 U/L em glicose e 2259 U/L em sacarose), quando comparada àquela obtida com bagaço de cana (1983 U/L). Particularmente em relação a xilose e glicose, demonstraram o caráter constitutivo das xilanases produzidas por *A. awamori*.

Palavras-chave: xilanases, bagaço de cana, *Aspergillus awamori*.

ABSTRACT

This technical contribution aimed at approaching the technological aspects of the xylanases production, dealing initially with the selection of microorganisms, within the groups of filamentous fungi and actinomycetes with capacity for producing those enzymes. The preliminary experiments of selection allowed pointing out *Aspergillus awamori* NRRL 3112 and *Aspergillus niger* as bearing the highest potential for xylanases production, producing mainly endo-xylanase, and cellulase in a less extent than the other strains. On the other hand, *A. awamori* was the strain that presented the highest endo-xylanasic volumetric activity (75 U/LH) and ability to produce- β -xilosidase in slightly higher levels than *A. niger*.

The sugar cane bagasse, finely ground and without previous treatment, was capable to sustain the growth of *A. awamori* and to induce the production of 2000 U/L of endo-xylanase and 1500 U/L of β -xilosidase.

The results obtained from simple sugars fermentations allowed evidencing a considerable increase in the value of the endo-xylanasic activity (4842 U/L in xylose, 4277 U/L in glucose and 2259 U/L in sucrose) when compared to that obtained with sugar cane bagasse (1983 U/L), particularly with regard to xylose and glucose, demonstrating the constitutive character of the enzymes produced by *A. awamori*.

Key words: xylanases, sugar cane bagasse, *Aspergillus awamori*.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são moléculas protéicas que atuam como catalisadores biológicos capazes de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto (ILLANES, 1994). A alta especificidade da função catalítica de uma enzima se deve a sua natureza protéica; isto é, a estrutura altamente complexa da proteína enzimática propicia tanto o ambiente para um mecanismo particular de reação como a capacidade de reconhecer um grupo limitado de substratos. De certo modo as enzimas são catalisadores ideais devido às suas elevadas especificidade e atividade em condições ambientais moderadas, o que lhes possibilita uma ampla gama de aplicações (CONN & STUMPF, 1980). As enzimas podem ser empregadas como sensores enzimáticos no controle de processos, na terapia clínica, no tratamento de efluentes, em células eletroquímicas, em síntese orgânica e em processos industriais.

Nos últimos 25 anos, o emprego de enzimas na indústria tem aumentado consideravelmente, mas ainda existe um grande campo para sua expansão, pois novas enzimas vão penetrando em outros ramos da indústria, criando, desta maneira, novas oportunidades de desenvolvimento tecnológico. Do total do mercado de enzimas, estima-se que cerca de 85% correspondem a usos do tipo industrial e que os 15% restantes correspondem a outros usos: analíticos, médicos etc.

O desenvolvimento do mercado de enzimas é um bom exemplo de aplicação da biotecnologia em nosso cotidiano. Os principais produtores são oriundos da Europa: a Novo Nordisk (Dinamarca), Gist-Brocades (Holanda) e Genecor International (Finlândia). Destas a Novo Nordisk detém uma percentagem de aproximadamente 50% do mercado mundial de enzimas industriais (NOVO NORDISK, 1992; BAJPAI & BAJPAI, 1996).

O mercado mundial de enzimas, embora significativo, ainda é modesto quando comparado ao de outros produtos biotecnológi-

cos, como é o caso do mercado de antibióticos, por exemplo. É difícil estimar este mercado, pois uma fração significativa das enzimas produzidas é empregada pelos mesmos produtores. Por outro lado, as estatísticas de produção são pouco confiáveis e de difícil acesso com exceção da norte-americana e a da Europa Ocidental. O mercado brasileiro de enzimas, por sua vez, possui uma parcela pouco representativa do mercado mundial, apesar de o Brasil ocupar uma posição privilegiada tanto em termos de biodiversidade quanto em relação a sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala.

O processo de obtenção das enzimas se dá pela extração de tecidos animais e vegetais ou por fermentação. Contudo, a maioria das enzimas empregadas nos processos industriais é de origem microbiana. Particularmente no caso das xilanases, bactérias e fungos têm mostrado habilidade para produzir este complexo enzimático.

Para a produção de enzimas microbianas, são utilizados basicamente dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água do meio: fermentação submersa e fermentação em meio sólido ou semi-sólido (FMSS). Esta última é definida como o processo no qual o crescimento microbiano se dá na superfície de materiais sólidos umedecidos, com ausência de água livre ou próximo dessa condição. Os suportes mais utilizados são a própria fonte de carbono de alto peso molecular, tais como celulose, amido, pectina e hemicelulose, entre outros (MUDGETT, 1986).

Tendo em vista a habilidade dos microrganismos para hidrolisar hemicelulose pensou-se na possibilidade de obtenção de xilanases utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, uma vez que a cana-de-açúcar é cultivada em grande escala em várias regiões do Brasil, produzindo altas quantidades de bagaço de cana que, apesar do seu uso como combustível na geração de energia, nas usinas de açúcar e álcool, ainda geram enormes excedentes.

O cultivo da cana-de-açúcar foi intensificado no Brasil como consequência do Programa Nacional de Álcool, estabelecido em 1975, desde que a economia brasileira foi grandemente afetada pela crise do petróleo em 1973. O gráfico da Figura 1.1 mostra a evolução da produção a partir de 1975.

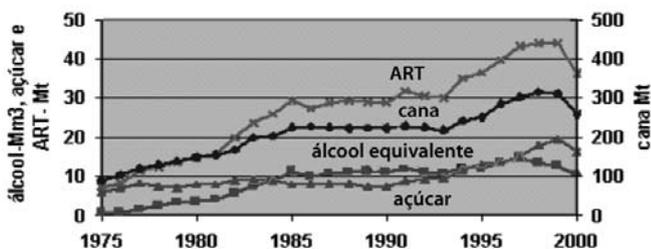


Figura 1.1. Produção de cana, açúcar e álcool.

Fonte: Ferreira (2003).

Até 1985, a produção de álcool cresceu consideravelmente, impulsionada pelo Pro-Álcool, enquanto a de açúcar estacionou. A queda do preço do petróleo, em meados da década de 80, levou à estagnação da produção de álcool combustível, somente rompida a partir dos primeiros anos da década de 90, quando também cresceu a produção de açúcar, efeitos aparentemente relacionados com a fase ascendente do Plano Real. Apesar dos percalços da indústria produtora de álcool e das ameaças da retirada do subsídio governamental, a cana-de-açúcar ainda é amplamente cultivada no Brasil e gera grandes quantidades de bagaço que podem ser aproveitadas como insumo para a obtenção de produtos de maior valor agregado (LALUCE, 1991).

O fracionamento da hemicelulose é um procedimento que tem chamado a atenção de alguns pesquisadores como uma possível fonte de açúcares fermentáveis, na forma monomérica ou macromolecular, para ser empregada na produção de combustíveis, principalmente de etanol (DU TOIT *et al.*, 1984). O emprego do bagaço de cana, previamente explodido, é uma alter-

nativa visada por outros pesquisadores para facilitar o ataque ao bagaço pelos microrganismos selecionados. Porém, ambos os procedimentos tornam-se onerosos. Desta forma, a obtenção dos produtos desejados utilizando o bagaço de cana sem tratamento prévio viabilizaria ainda mais o custo de produção, pois as etapas de fracionamento dos componentes lignocelulósicos são intensivas em energia.

Nos últimos 25 anos, muitas pesquisas envolvendo a produção enzimática têm sido realizadas com o objetivo de melhorar a coloração das pastas celulósicas. O uso de enzimas xilanásicas no pré-tratamento de polpas celulósicas vem ganhando vários adeptos, em função das campanhas ambientais promovidas por grupos como o *Greenpeace* e também por causa da conscientização de governos, como é o caso do canadense, do norte-americano e do europeu. Todos eles empenhados em encontrar alternativas para diminuir os impactos ambientais provocados por produtos tóxicos que se formam durante o branqueamento das polpas, principalmente quando é usado cloro elementar (HILEMAN *et al.*, 1994; NOTHENBERG, 1995; PARK, 1995). O cloro e seus derivados são amplamente usados nas fábricas do mundo inteiro, principalmente pela sua eficiência no branqueamento do papel e custo competitivo. Dentre as enzimas mais estudadas até agora, destacam-se as ligninases e as xilanasas. A importância das últimas está associada à possibilidade de emprego das enzimas propriamente ditas, dispensando o uso direto do microrganismo produtor. No que diz respeito às ligninases, a aplicação da tecnologia enzimática se torna de difícil aplicação devido à incapacidade de oxidar compostos na ausência do fungo (KATAGIRI *et al.*, 1995).

De acordo com JEFFRIES *et al.* (1992), o emprego de xilanasas reduz o consumo de alvejantes químicos de 30 a 50%, em polpas de madeiras duras, e de 20 a 30%, em polpas de madeiras moles. Estes resultados são significativos quando se trata de reduzir a carga de compostos químicos empregada no branqueamento do papel, obtendo desta forma uma diminuição

de elementos tóxicos nos efluentes das fábricas e a redução do impacto ambiental tão criticado por grupos ambientalistas.

O mercado oferece várias enzimas xilanolíticas que, de modo geral, possuem condições brandas de trabalho. É claro que a descoberta de linhagens que produzem enzimas estáveis a altas temperaturas e valores de pH alcalinos seria mais adequada se o objetivo fosse o emprego das mesmas no tratamento de polpas *kraft*.

O nosso interesse na obtenção de enzimas xilanásicas, utilizando a fermentação em meio semi-sólido (FMSS), reside no fato de que este processo apresenta algumas vantagens econômicas em comparação ao processo submerso, sendo relacionadas principalmente com a diminuição de energia requerida. Este trabalho insere-se exatamente nesse contexto, pois um de seus objetivos principais foi o de produzir xilanases pelo aproveitamento do bagaço de cana, sem tratamento prévio, com o intuito de minimizar os custos de produção, além de selecionar o microrganismo com maior potencial para produção dessas enzimas.

2. MICRORGANISMOS QUE DEGRADAM HEMICELULOSE

Vários microrganismos, incluindo aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos, têm sido estudados em função de sua habilidade em sintetizar enzimas com atividade xilanásica. A maioria dos estudos tem sido conduzida com aeróbios, fungos mesófilos e bactérias (BIELY, 1985). Na Tabela 2.1 são mostrados alguns microrganismos produtores dessas enzimas.

Boa parte das pesquisas sobre hidrólise enzimática de xilanas tem sido realizada com sistemas fúngicos. Em pesquisas recentes fungos mesófilos, como *Trichoderma reesei*, e termófilos, como *Thermomyces lanuginosus*, foram estudados com o intuito de produzir sistemas enzimáticos pobres em celulasas, visando à extrapolação de escala para produção industrial de enzimas xilanásicas (GAMERITH *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1993; OKSANEN *et al.*, 2000; XIONG *et al.*, 2003; XIONG *et al.*, 2004).

Os actinomicetos apresentam amplas habilidades degradativas, razão pela qual despertaram a atenção de pesquisadores que têm se dedicado ao estudo da produção enzimática por esses microrganismos.

Tabela 2.1. Microrganismos produtores de enzimas xilanásicas.

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Bacillus coagulans</i> T26 FS xilana "birchwood"	250		
<i>Bacillus pumilus</i> T30FS xilana "birchwood"	1250		Deschamps <i>et al.</i> (1882)
<i>Corynebacterium sp</i> Q42 FS xilana birchwood"	350		
<i>Trichoderma reesei</i> M9414 FS Hidrolisado de hemicelulose	1000-1500	50-80	Dekker (1983)

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β-xilosidase (U/L)	Referência
<i>Neurospora crassa</i> FS xilana	14000	25	Mishra <i>et al.</i> (1984)
<i>Pseudonocardia thermophila</i> FS Xilana	3,90		Zimmermann <i>et al.</i> (1988)
<i>Sacharomonospora viridis</i> FS Xilana	17,90		
<i>Streptomyces flavogriseus</i> FS farelo de trigo	1590		Johnson <i>et al.</i> (1988)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> FS farelo de trigo	10280		
<i>Streptomyces C-248</i> FS farelo de trigo	4480		
<i>Streptomyces C-254</i> FS farelo de trigo	6440		
<i>Streptomyces lividans</i> FS xilana	12,20		Zimmermann <i>et al.</i> (1988)
<i>Actinomadura sp</i> MT809 FS Xilana	58,80		
<i>Microbispora bispora</i> FS Xilana	11,20		
<i>Streptomyces cyaneus</i> FS xilana	36,60		
<i>Termoactinomyces vulgaris</i> FS Xilana	3,50		

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Aspergillus ochraceus</i> FS			Biswas <i>et al.</i> (1988)
palha de trigo	12800	3200	
farelo de trigo	14200	5700	
bagaço de cana	8500	2400	
FMSS			
palha de trigo	24400	5100	
farelo de trigo	28100	8100	
bagaço de cana	18600	5100	
<i>Aspergillus awamori</i> FS			Smith & Wood (1991)
Palha de aveia moída	13100	2856	
Palha de cevada moída	8900	1630	
xilana "oat spelt"	18900	3660	
xilana "larch wood"	10100	260	
Glucose	200	70	
Xilose	2700	680	
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 FS	350000		Gamerith <i>et al.</i> (1992)
<i>Cephalosporium</i> FS farelo de trigo	36200		Bansod <i>et al.</i> (1993)
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> FS			Lee <i>et al.</i> (1993)
celulose	3	11	
xilana	57	272	
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> FS			
Maltose	3	58	
Xilose	26	87	
Glucose	3	11	
Arobinose	6	73	

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Aspergillus nidulans</i> FS			Gosh <i>et al.</i> (1993)
xilana "oat spelt"	3360	1760	
palha de trigo	1465	1720	
farelo de trigo	1100	1140	
palha de arroz	985	840	
bagaço de cana	565	440	
xilose	3050	1240	
<i>Panerochaete chrysosporium</i> FS Arabinoxilana oat spelt	277	57	Patiño <i>et al.</i> * (1993)
<i>Aspergillus niger</i> CCM1 850 FS Xilana	65000		Costa-Ferreira <i>et al.</i> * (1994)
<i>Aspergillus fischeri</i> FXN1 FS			Raj & Chandra (1995)
Xilose	31000		
Glucose	4000		
Xilana	40600		
farelo de trigo	41800		
palha de arroz	11300		
bagaço de cana	10700		

2.

M
I
C
R
O
R
G
A
N
I
S
M
O
S

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Aspergillus sp</i> FMSS sabugo de milho	37100	3010	Kadowaki <i>et al.</i> (1995)
<i>Aspergillus flavus</i> var 1 FMSS sabugo de milho	35800	3800	
<i>Aspergillus flavus</i> var 2 FMSS sabugo de milho	58400	4530	
<i>Aspergillus parasiticus</i> FMSS sabugo de milho	54100	2140	
<i>Aspergillus niger</i> var 1 FMSS sabugo de milho	47900	5170	
<i>Aspergillus niger</i> var 2 FMSS sabugo de milho	35500	4040	
<i>Aspergillus tamarii</i> FMSS sabugo de milho	53000	2310	
<i>Aspergillus fumigatus</i> FMSS sabugo de milho	54100	2320	
<i>Aspergillus flavus</i> var 2 FS Xilana	50800	930	
<i>Aspergillus tamarii</i> FS Xilana	42300	1040	
<i>Aspergillus fumigatus</i> FS Xilana	40400	1020	
<i>Aspergillus parasiticus</i> FS Xilana	51700	850	
<i>Aspergillus niger</i> var 1 FS Xilana	42500	2050	

Microrganismo/condição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Aspergillus tamarii</i> FS			Simão <i>et al.</i> (1995)
xilana "birchwood"	38800	1800	
xilana de aveia	41400	29000	
sabugo de milho	33550	240000	
bagaço de cana	22900	3890	
CMCelulose	450	nd	
Xilose	1480	510	
β -D-metil-xilosídeo	97700	1190	
Glucose	10	180	
<i>Aspergillus tamarii</i> FS			Kadowaki <i>et al.</i> (1997)
xilana "birchwood"	43420	290	
xilana" oat spelt"	94630	420	
sabugo de milho	76610	240	
farelo de trigo	54320	510	
bagaço de cana	16680	280	
celobiose	5230	90	
lactose	6810	100	
Xilose	8210	160	
Glucose	1760	80	
CMcelulose	3480	80	

2.

M
I
C
R
O
R
G
A
N
I
S
M
O
S

Microrganismo/con-dição/fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)	Referência
<i>Aspergillus sp</i> FS			Angelo <i>et al.</i> (1997)
xilana "birchwood"	134000	9000	
xilana "oat spelt"	120000	17000	
xilana de eucalipto	117000	10000	
xilana "larchwood"	140000	9100	
xilana de pinheiro	68000	18000	
xilose	72000	800	
<i>Aspergillus sp</i> FMSS Bagaço de cana	1968*		Gutierrez-Correa & Tengerdy (1998)
<i>Trichoderma reesei</i> FMSS Bagaço de cana	1780*		
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8 FMSS farelo de trigo	40260		Couri <i>et al.</i> (2000)

FS = fermentação submersa; FMSS = fermentação em meio semi-sólido; * Unidade = U/g matriz seca

Enzimas como a xilanase e β -xilosidase, que degradam a cadeia principal de xilanas, assim como a α -L-arabinofuranosidase e acetil xilana estearase, que hidrolisam a cadeia lateral, já foram detectadas em vários actinomicetos, entre os quais o gênero *Streptomyces* tem sido amplamente estudado (MAC KENZIE *et al.*, 1987; BALL & MCCARTHY, 1988; JOHNSON *et al.*, 1988; PATEL *et al.*, 1993; TECHAPUN *et al.*, 2003).

A respeito da atividade bacteriana sobre hemicelulose, o gênero *Bacillus* parece o mais eficiente para produção de xilanases. Este gênero é o mais utilizado em fermentações industriais, pela habilidade de excretar as enzimas sintetizadas (CHESSON & CODNER, 1978; BERNIER *et al.*, 1983). Bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* e *Bacillus* já foram estudadas comparativamente em função da capacida-

de de degradação de xilanas, obtendo os melhores resultados com os dois últimos gêneros (DESCHAMPS *et al.*, 1982; FAULDS *et al.*, 1995). Bactérias presentes em amostras fecais de seres humanos (*Bacteroides* e *Ruminococcus* sp), bem como no rúmen bovino (*Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*), apresentaram capacidade de hidrolisar alguns tipos de xilanas (PETTIPHER & LATHAM, 1979; FORSBERG *et al.*, 1981; WEDEKIND *et al.*, 1988; MATTE & FORSBERG, 1992; AURILIA *et al.*, 2000).

Com base nos trabalhos avaliados, um grande número de microrganismos estudados apresentou atividade enzimática extracelular. Entretanto, BALL & MCCARTHY (1988), estudando 200 cepas de actinomicetos, detectaram quantidades significativas de atividade intracelular em algumas cepas.

De acordo com as pesquisas de LEE *et al.* (1993) com *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6HRI, baixas concentrações de xilanas conduzem a produção extracelular de xilanases. No entanto, o aumento da concentração do substrato torna a atividade predominantemente associada à célula.

2.

M
I
C
R
O
R
G
A
N
I
S
M
O
S

3. OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVA

O Brasil, por suas características climáticas e territoriais, ocupa no mundo uma posição privilegiada tanto em termos de biodiversidade quanto em relação a sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala. Em termos de produção e uso de enzimas, existe abundância de matérias-primas que podem ser transformadas, via processos fermentativos, em enzimas e outros produtos de alto valor agregado (Bon, 1995).

Em face da grande quantidade de trabalhos reportados na literatura sobre o emprego de bagaço de cana na produção de sistemas enzimáticos, inclusive xilanases, e o interesse por descobrir processos exequíveis a partir de matérias-primas lignocelulósicas, empregando microrganismos, a presente pesquisa visou estudar a viabilidade do emprego de bagaço de cana, finamente dividido, por microrganismos com potencial para produção de xilanases, utilizando a fermentação em meio semi-sólido.

3.1 Objetivos Específicos

Partindo-se de uma revisão bibliográfica, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- ▶ Seleção de microrganismos com potencial para a produção de xilanases em bagaço de cana, sem tratamento prévio (nove fungos filamentosos e cinco actinomicetos);
- ▶ Caracterização das enzimas produzidas com a linhagem selecionada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram empregadas nove linhagens de fungos filamentosos e cinco de actinomicetos, algumas das quais conhecidas como produtoras de enzimas xilanolíticas, com o intuito de selecionar o microrganismo de maior potencial para produção das enzimas em estudo. Os microrganismos empregados, bem como suas procedências, estão exibidos na Tabela 4.1.

4.1.1 MEIOS DE MANUTENÇÃO

Os fungos filamentosos foram cultivados em meios específicos com a seguinte composição: **Meio PDA** (em g/L): cubos de batata, 300; glucose, 20; agar, 15; pH = 6,0. **Meio Czapeck** (em g/L): glicose, 20; NaNO_3 , 2; K_2HPO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; Agar, 1; pH = 6,0. Os actinomicetos foram mantidos em **Meio amido-agar**, sendo a sua composição (em g/L): amido solúvel, 10; K_2HPO_4 , 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; NaCl , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; CaCO_3 , 2; solução de oligoelementos (SOE), 1 ml; agar, 20. SOE (em g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0. As culturas foram mantidas por transferências periódicas para meios novos a cada três meses.

Tabela 4.1. Microrganismos empregados na seleção do melhor produtor de enzimas xilanásicas

Microrganismos	Procedência
<i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3122	Northern Regional Research Lab. (USA)
<i>Aspergillus niger</i>	DEB-EQ-UFRJ (a)
<i>Trichoderma harzianum</i>	DM/IOC (b)
<i>Gliocladium virens</i>	DM/IOC (b)
<i>Paecilomyces variotti</i>	DM/IOC (b)
<i>Penicillium wortmanii</i>	DM/IOC (b)
<i>Aureobasidium pullulans</i> 3775	DM/IOC (b)

Microrganismos	Procedência
<i>Aureobasidium pullulars</i> 3467	DM/IOC (b)
<i>Aureobasidium</i> sp 3011	DM/IOC (b)
<i>Streptomyces</i> T13	IM/CCS-UFRJ (c)
<i>Streptomyces</i> R500	IM/CCS-UFRJ (c)
<i>Streptomyces</i> sp	DEB/EQ-UFRJ (a)
<i>Streptomyces viridis</i>	DAB/UFPE (d)
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	DAB/UFPE (d)

(a) Departamento de Engenharia Bioquímica - Escola de Química da UFRJ; (b) Departamento de Microbiologia - Instituto Oswaldo Cruz; (c) Instituto de Microbiologia - Centro de Ciências da Saúde da UFRJ; (d) Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.2 Pré-seleção em placas de Petri

Os microrganismos foram inicialmente cultivados em placas de Petri, e a composição dos meios utilizados nesta avaliação é mostrada na Tabela 4.2. A inoculação das placas foi feita utilizando um furador de aproximadamente um centímetro de diâmetro; foram retiradas porções centrais das placas agarizadas e substituídas por porções de igual tamanho, previamente inoculadas com o microrganismo correspondente. Os microrganismos selecionados foram aqueles que apresentaram algum tipo de crescimento após a substituição do meio agarizado.

Tabela 4.2. Composição dos meios empregados na pré-seleção

Composição	Meio 1 (%)	Meio 2 (%)	Meio 3 (%)	Meio 4 (%)
Peptona	0,25	0,00	0,00	0,25
Extrato de levedura (EL)	0,25	0,25	0,00	0,25
KH_2PO_4	0,10	0,10	0,10	0,10
MgSO_4	0,02	0,02	0,02	0,02
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10
Bagaço de cana	2,00	2,00	2,00	0,00

4.2.1 MEIO DE CRESCIMENTO (EM PLACAS DE PETRI)

O meio empregado para crescimento das culturas foi o **Meio com bagaço de cana** cominuído (aproximadamente 1mm de comprimento), apresentando a seguinte composição (em g/L): peptona, 2,5; extrato de levedura, 2,5; K_2HPO_4 , 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; NaCl, 1,0; bagaço de cana, 20; agar, 20; pH = 6,0.

4.3 Pré-seleção – Fermentação submersa (FS)

As amostras em duplicata foram agitadas a 170 rpm, em agitador rotatório, a uma temperatura de 30°C. Após o período de incubação pertinente, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de Buchner com papel de filtro Whatman, nº 4. Desta forma, o filtrado livre de células foi submetido às análises de atividades enzimáticas.

4.3.1 MEIO DE PRODUÇÃO – FS

O meio utilizado para produção das enzimas por fermentação submersa foi o mesmo indicado acima para crescimento das culturas, porém isento de agar. Utilizou-se, também, xilana na concentração de 6 g/L, a fim de se comparar o desempenho da fermentação com essa fonte de carbono solúvel àquela conduzida com bagaço de cana íntegro. A concentração de xilana utilizada nesse experimento foi escolhida em função do seu teor no bagaço de cana, que é de aproximadamente 30% (p/p).

4.3.2 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo fúngico foi obtido a partir de culturas semeadas em garrafa de Roux, utilizando o meio de crescimento agarizado, após 6 dias de cultivo. Os esporos foram, então, removidos das garrafas, suspensos em 10 ml de água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer para padronização dos inóculos. Foram adicionados 106 esporos por mL de meio. Os inóculos para os experimentos com actinomicetos foram obtidos a partir de tubos contendo meio de manutenção, previamente inoculados com o microrganismo correspondente. De cada tubo

foi removido um bloco de gelose de aproximadamente 1 cm de diâmetro e inoculado em 5 ml de meio, cuja composição era semelhante a dos meios de produção, diferindo apenas na fonte de carbono; pois o bagaço de cana foi substituído por xilose numa concentração de 15 g/L. Após 3 dias de crescimento, a 30°C e 150 rpm, o conteúdo do tubo foi transferido para o meio de produção propriamente dito. A Tabela 4.3 resume o resultado da concentração de biomassa de actinomicetos transferida aos meios de produção.

Tabela 4.3. Concentração da biomassa de actinomicetos adicionada aos meios de produção.

Microrganismo	g/L
<i>Streptomyces viridis</i>	0,48
<i>Streptomyces</i> T13	1,46
<i>Streptomyces sp</i>	1,04
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	0,38
<i>Streptomyces</i> R500	2,00

4.4 Metodologia Analítica

4.4.1 AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram medidos colorimetricamente pelo método de SOMOGYI (1952) e/ou pelo método do Ácido di-nitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959).

4.4.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Endo- β (1-4)-xilanase

A atividade endo-xilanásica foi estimada de acordo com a metodologia descrita por Gamerith (1992). Foi determinada indiretamente pela hidrólise de xilana "birchwood", dosando os açúcares redutores pelo método SOMOGYI (1952). *A atividade foi expressa em moles de xilose liberada por hora por litro de extrato enzimático (U/L).*

β -xilosidase

A atividade β -xilosidásica foi determinada pela dosagem de p-nitrofenol liberado a partir de p-nitrofenil- β -D xilopiranosídeo (PNPX), seguindo a metodologia de Dekker (1983). O p-nitrofenol liberado ao meio foi medido em espectrofotômetro a 410 nm. *A atividade foi expressa em moles de p-nitrofenol liberado por hora por litro de extrato enzimático (U/L).*

Celulases

O ensaio para determinação da atividade celulásica foi feito adicionando-se 1 ml de solução enzimática bruta e substrato em 1 ml de tampão de fosfato de sódio 0,1 M, em pH 6,5. **Celulases Cx e C1** foram determinadas usando como substrato 10 mg de CMC (Carboximetilcelulose) e 50 mg de algodão, respectivamente. Após a incubação, a 50°C, por 10 min para Cx e 60 min para C1, as enzimas foram inativadas com 1 ml de NaOH 1 N, e os açúcares redutores dosados pelo método de SOMOGYI (1952), tendo glicose como padrão. *As atividades enzimáticas foram expressas em moles de glicose por hora por litro de extrato enzimático (U/L).*

4.

M
A
T
E
R
I
A
I
S

E

M
É
T
O
D
O
S

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos microrganismos, entre eles bactérias e fungos, têm demonstrado capacidade para hidrolisar hemicelulose, produzindo, às vezes, não só um tipo mas também um complexo de enzimas. A maioria das pesquisas envolvendo hidrólise de xilana tem sido realizada com fungos filamentosos. No entanto, os actinomicetos também têm mostrado capacidade para hidrolisar este tipo de polissacarídeo.

Na fase inicial do trabalho, treze linhagens pertencentes aos fungos filamentosos e aos actinomicetos foram cultivadas nas mesmas condições, a fim de se avaliar a de maior potencialidade para produção das enzimas $\beta(1-4)$ -xilanas e β -xilosidase, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono tanto na composição dos meios de cultivo quanto de produção.

Após os experimentos em placa, conduziram-se experimentos em frascos agitados com a intenção de avaliar comparativamente o desempenho dos microrganismos selecionados nesta primeira etapa. Ressalta-se, ainda, que as espécies selecionadas tiveram os seus desempenhos avaliados em fermentação submersa (FS), utilizando bagaço de cana na sua forma íntegra sem nenhum tratamento prévio.

Estudou-se ainda a produção enzimática utilizando açúcares simples, visando determinar o caráter indutivo ou constitutivo das enzimas produzidas pelo microrganismo selecionado.

5.1 Pré-seleção

O crescimento dos microrganismos em placas de Petri serviu para fazer a seleção inicial dos mesmos. A composição dos quatro meios utilizados nesta avaliação pode ser vista na Tabela 4.2 de Materiais e Métodos.

O desempenho dos microrganismos utilizados na presente série de experimentos foi avaliado em meios constituídos por bagaço de cana, como fonte de carbono, de aproximadamente 1

mm de comprimento, podendo ser visualizado nas Figuras 5.1 e 5.2. Aparentemente, os três meios empregados parecem ter proporcionado as condições adequadas para o desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, os meios M1 e M2 foram aqueles que permitiram o melhor desenvolvimento microbiano, tanto em extensão e produção abundante de micélio como em rapidez. Era de se esperar que isto acontecesse, uma vez que M1 era o meio completo, formulado utilizando duas fontes de nitrogênio: peptona e EL. O meio M2 diferia de M1 apenas pela ausência de EL. Por outro lado, vale ressaltar que, apesar dos fungos apresentarem um halo de crescimento semelhante ao verificado em M1 e M2, quando cultivados em M3 (sem fontes de nitrogênio), observou-se pouquíssima produção de micélio e de esporos nas placas; evidenciando, desta forma, a carência de um nutriente importante como o nitrogênio. Na maioria dos actinomicetos, tampouco foi observado crescimento micelial no meio M3, com exceção de *Streptomyces* R500. Isto sugere que os actinomicetos são microrganismos mais exigentes do que os fungos em relação às fontes de nitrogênio.

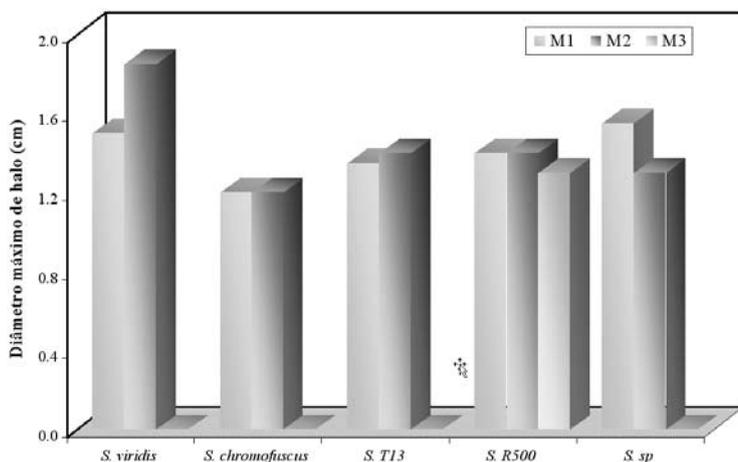
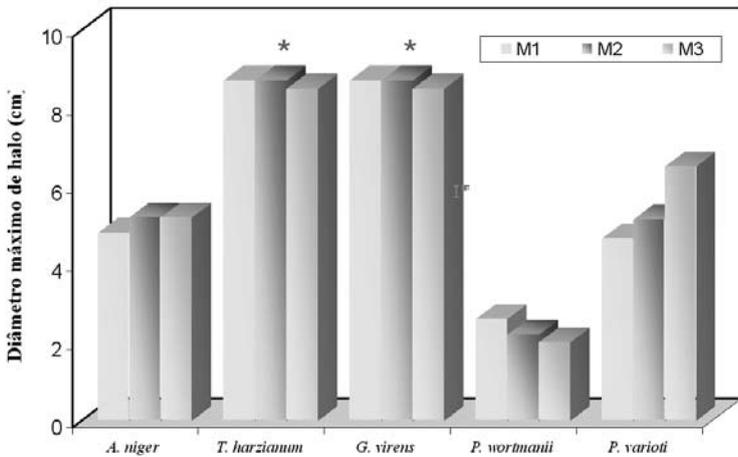


Figura 5.1. Crescimento de actinomicetos em M1, M2 e M3
Os valores são resultado de triplicatas.



*: refere-se aos dados do 3º dia. Os dados referentes aos demais microrganismos são do 4º dia.

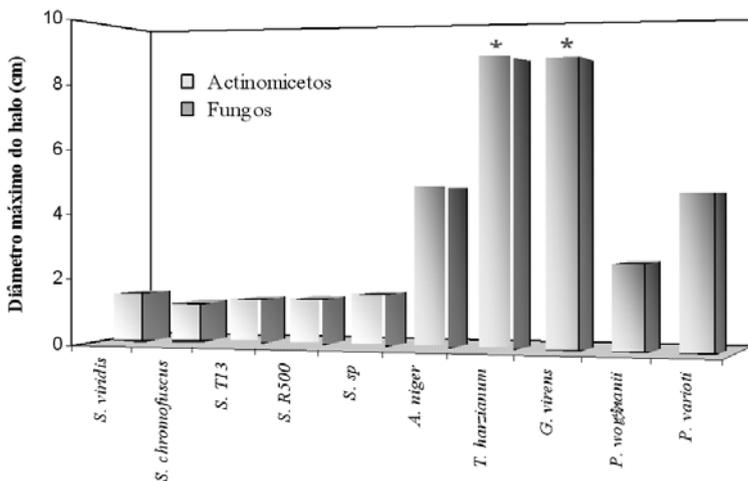
Figura 5.2. Crescimento de fungos em M1, M2 e M3
Os valores são resultado de triplicatas.

Particularmente em fungos, a hifa inicial cresce aceleradamente até atingir uma taxa linear máxima de crescimento; sendo iniciada, a partir deste momento, a ramificação, que aumenta exponencialmente com o tempo. Nesses termos, a ramificação micelial é análoga à divisão celular dos microrganismos unicelulares, podendo ser afetada pelos componentes do meio, principalmente pelas fontes de carbono e de nitrogênio, as quais interferem diretamente na densidade da ramificação e no tempo de formação do micélio (GRIFFIN, 1994).

Portanto, ao comparar o desenvolvimento dos microrganismos nos meios utilizados neste experimento, verificamos que *T. harzianum* e *G. virens* foram os que apresentaram maior extensão e rapidez no crescimento. Este fato torna-se mais evidente na Figura 5.3, que mostra o resultado global dos dois experimentos precedentes.

Os melhores resultados foram observados com *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium virens*, que exibiram um crescimento in-

tenso. *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotti* e *Penicillium wortmanii* mostraram um crescimento moderado e os actinomicetos, um crescimento de moderado a fraco.



*: refere-se aos dados do 3º dia, enquanto os outros referem-se ao 4º dia.

Figura 5.3. Crescimento de fungos e actinomicetos em M1. Os valores são resultado de triplicatas.

5.2. Seleção

As linhagens avaliadas na primeira etapa deste trabalho: *Streptomyces viridis*; *Streptomyces chromofuscus*; *Streptomyces sp*; *Streptomyces T13*; *Streptomyces R500*; *Trichoderma harzianum*; *Paecilomyces variotii*; *Penicillium wortmanii*; *Gliocadium virens* e *Aspergillus niger* foram cultivadas em meio M1, em frascos agitados, empregando a batelada simples como forma de condução do processo. *Aspergillus awamori* foi incluído e também avaliado a partir desta etapa de seleção.

Analisando os resultados da Tabela 5.1 pode-se afirmar que as produções máximas de endo-xilanase (2080, 2000 e 1810 (U/L) β -xilosidase (2056, 1600 e 2225 U/L) foram alcançadas por

A. niger, *A. awamori* e por *T. harzianum*, respectivamente. Os dados da literatura, resumidos na Tabela 2.1, mostram que, em se tratando de endo-xilanases, a maioria das linhagens estudadas por outros pesquisadores exibiu atividades enzimáticas muito maiores do que as apresentadas pelos fungos filamentosos estudados no presente trabalho.

As fontes de carbono empregadas por esses pesquisadores foram as mais variadas, mas mesmo aqueles que empregaram bagaço de cana como fonte de carbono obtiveram resultados maiores, com exceção de GOSH *et al.* (1993), que utilizaram *A. sidowii* e obtiveram um valor de atividade endo-xilanásica igual a 565 U/L. Em relação à β -xilosidase obtivemos resultados comparáveis aos reportados na literatura.

Observando os resultados mostrados na Tabela 5.1 podemos dizer que, no que tange aos actinomicetos utilizados no presente trabalho, as atividades endo-xilanásica β -xilosidásica apresentaram baixíssimos valores em relação aos dos diversos gêneros citados pela literatura (Tabela 2.1). Esses microrganismos também exibiram resultados baixos quando comparados aos de algumas espécies de *Streptomyces* pesquisadas por JHONSON *et al.* (1988). No entanto, podemos encontrar na Tabela 2.1 resultados correspondentes à pesquisa de ZIMMERMANN *et al.* (1988), que mostraram valores muito mais baixos para endo-xilanase do que os obtidos com *S. R500* e *S. chromofuscus*.

Tabela 5.1. Atividades enzimáticas dos microrganismos usados na seleção

Microrganismos	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)
<i>Aspergillus niger</i>	2080	2056
<i>Aspergillus awamori</i>	2000	1600
<i>Trichoderma harzianum</i>	1810	2225
<i>Gliocladium virens</i>	1270	550
<i>Paecilomyces variotti</i>	0	0
<i>Penicillium wortmanii</i>	500	0

Microrganismos	Endo-xilanase (U/L)	β -xilosidase (U/L)
<i>Streptomyces</i> T13	271	0
<i>Streptomyces</i> R500	634	0
<i>Streptomyces</i> sp	50	0
<i>Streptomyces viridis</i>	50	0
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	482	46

No que diz respeito às celulases C1 e Cx, as atividades enzimáticas máximas foram obtidas com *T. harzianum* e *G. virens*, cujos valores respectivos foram de 31 e 8 U/L, para celulase C1, e de 257 e 155 U/L, para celulase Cx. Quanto a *A. niger* e *A. awamori*, as atividades celulásicas foram um pouco mais baixas do que as obtidas com as linhagens mencionadas anteriormente, 7,5 e 11, para celulase C1, e 47 e 145 U/L, para celulase Cx, respectivamente. As determinações de celulases foram feitas com o objetivo de identificar, dentre as linhagens empregadas nesta pesquisa, quais eram capazes de produzir menores quantidades de celulases, uma vez que existe interesse de aplicação das endo-xilanases na indústria de papel e celulose.

Informações da literatura indicam que tanto xilanase quanto celulase são produzidas por uma variedade de fungos e bactérias. Dentre os microrganismos estudados no presente trabalho, o gênero *Trichoderma* é notável produtor de celulase, geralmente produzida em companhia de xilanase durante o crescimento do fungo em celulose e xilana. Contudo, a especificidade na indução e atividade dessas enzimas ainda não está bem caracterizada, podendo variar de microrganismo para microrganismo e em função do pH, dos sais minerais e do tempo de incubação, pois a produção de celulase e xilanase não é necessariamente sincronizada e pode possuir fases 'lag' dependentes do tipo de substrato (ROYER & NAKAS, 1990; WONG & SADDLER, 1992).

Por outro lado, *A. niger* não é considerado um produtor de celulases, e os baixos valores de atividade obtidos neste traba-

lho corroboram esta informação, aumentando, desta forma, o potencial de uso de suas enzimas na indústria de papel e celulose.

Portanto, uma vez que não existem diferenças consideráveis entre *A. niger*, *A. awamori* e *T. harzianum* quanto à expressão de endo-xilanase e β -xilosidase em bagaço de cana e, considerando que a produção de celulasas é menor para as linhagens de *Aspergillus* nesta fonte de carbono, optou-se por *A. niger* e *A. awamori* para dar continuidade ao trabalho. Desta forma, ambos os microrganismos foram cultivados em meios contendo bagaço de cana ou xilana com o intuito de se avaliar comparativamente a capacidade de produzir xilanases. Ressalta-se que a concentração de xilana (6 g/L) utilizada nesta série de experimentos corresponde a, aproximadamente, 30% da composição total do bagaço de cana. Os resultados deste experimento estão mostrados nas Figuras 5.4 e 5.5, nas quais se observa que tanto *A. niger* (Figura 5.4) quanto *A. awamori* (Figura 5.5) produziram atividades semelhantes de endo-xilanases no meio que continha bagaço de cana (aproximadamente 2000 U/L). No entanto, em termos de produtividade volumétrica máxima, *A. awamori* (75 U/Lh) foi duas vezes superior a *A. niger* (41 U/Lh).

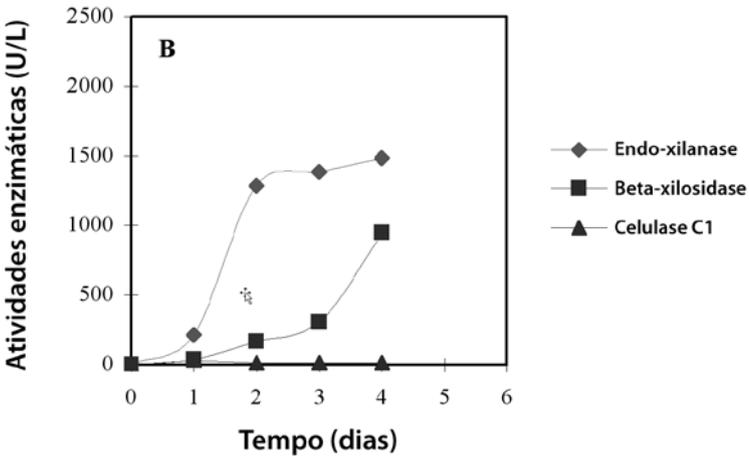
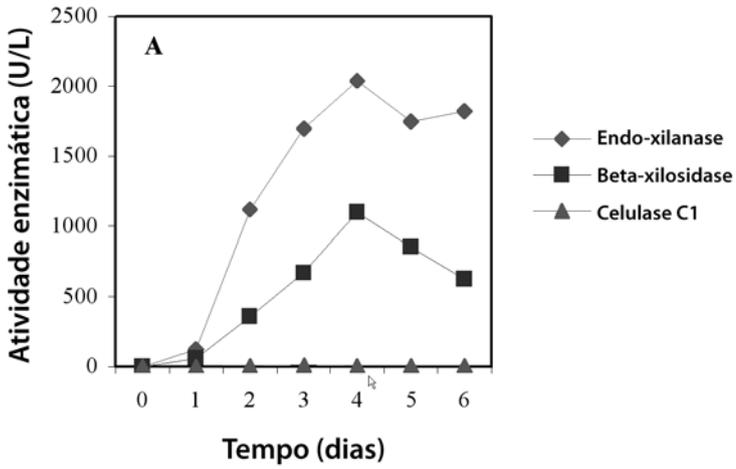


Figura 5.4. Produção de enzimas por *A. niger* em bagaço de cana 20 g/L (A) e xilana 6 g/L (B).

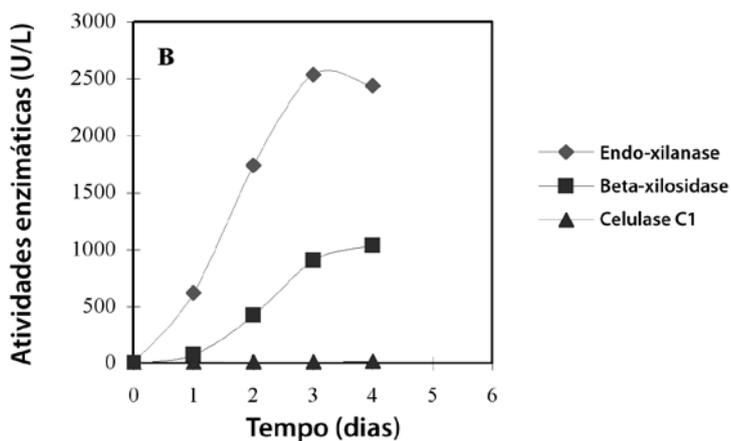
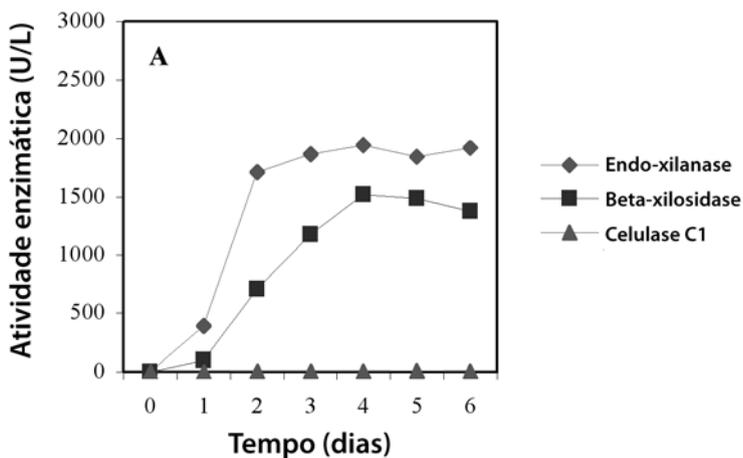


Figura 5.5. Produção de enzimas por *A. awamori* em bagaço de cana 20 g/L (A) e xilana 6 g/L (B).

A determinação das atividades enzimáticas utilizando xilana permitiu analisar o comportamento de ambos os microrganismos em uma fonte de carbono mais facilmente metabolizável, quando comparada com o complexo lignocelulósico íntegro. Diferentemente dos experimentos utilizando bagaço de cana, a produção de endo-xilanase em frascos que continham xilana mostrou-se 40% favorecida, quando o cultivo foi realizado com *A. awamori*, o mesmo não se verificando com *A. niger*.

Quanto ao emprego de bagaço de cana ou de xilana como fontes de carbono, os resultados indicaram a preferência de *A. niger* por bagaço de cana (1983 50 U/L em bagaço e 1485 61 U/L em xilana) e a de *A. awamori* por xilana (2537 30 U/L em xilana e 1983 55 U/L em bagaço de cana). Observa-se ainda que a produção de β -xilosidase foi semelhante para ambos os microrganismos nos meios de produção avaliados, diferindo apenas para *A. awamori* cultivado em bagaço de cana, cuja atividade foi 50% maior.

Comparando a capacidade indutora da xilana com a de outros substratos podemos dizer, com base nos resultados da literatura apresentados na Tabela 2.1, que xilana, de um modo geral, induz a produção enzimática em maior grau do que bagaço de cana. Era lícito esperar um melhor desempenho utilizando xilana como fonte de carbono, por se constituir em um material mais acessível aos microrganismos, facilitando a sua assimilação; no entanto, este fato só foi observado para *A. awamori* no que diz respeito a endo-xilanase. Ressalta-se que as diferentes expressões enzimáticas entre os microrganismos, ao utilizarem diversas fontes de carbono, devem ser decorrentes de características particulares do metabolismo de cada espécie, das condições ambientais de cultivo e ainda do processo de fermentação.

Após avaliação dos resultados acima expostos, optamos por *A. awamori* para dar continuidade ao presente estudo, tendo em vista a sua superioridade quanto à produtividade em endo-xilanase e capacidade em produzir quantidades de β -xilosidase

5.

R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

E

D
I
S
C
U
S
S
Ã
O

ligeiramente superiores às de *A. niger*. Embora os resultados em atividades xilanásicas tenham sido mais baixos do que os apontados na literatura, optou-se por trabalhar com a linhagem de maior potencial e investir na otimização do meio de produção.

Os resultados obtidos no presente estudo nos levam a considerar a viabilidade do emprego de bagaço de cana na sua forma íntegra, uma vez que as atividades enzimáticas são expressas razoavelmente neste substrato. A capacidade das espécies em utilizar o bagaço na forma íntegra aponta para um grande potencial industrial devido à possibilidade de diminuir os custos de produção, não sendo necessária a hidrólise da matéria-prima ou qualquer outro tipo de pré-tratamento que venha a onerar o processo.

5.3 Avaliação preliminar do caráter constitutivo e/ou indutivo de xilanases produzidas por *A. awamori*

Dando prosseguimento ao estudo, realizou-se o cultivo de *A. awamori* em açúcares simples com o objetivo de estudar o caráter indutivo ou constitutivo das enzimas com atividade xilanásica.

Os resultados obtidos a partir das fermentações com açúcares simples (Figura 5.6) evidenciaram um aumento considerável no valor da atividade endo-xilanásica (4842 U/L em xilose, 4277 U/L em glicose e 2259 U/L em sacarose), quando comparada àquela obtida com bagaço de cana (1983 U/L), particularmente em relação a xilose e glicose. Ocorre, no entanto, que, no trabalho executado por KADOWAKI *et al.* (1997), os resultados mostraram o fenômeno oposto, pois as fermentações com bagaço de cana ou xilana exibiram resultados superiores aos alcançados com xilose e glicose. Todavia, na pesquisa conduzida por SIEDENBERG *et al.* (1998), os dados apontaram a ausência de atividade xilanásica durante o cultivo da linhagem de *A. awamori* CBS 11152 em xilose e glicose e salientaram

que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em meio sintético contendo xilana.

Alguns autores (MILAGRES *et al.*, 1993; KRISTUFEK *et al.*, 1995; RAJ & CHANDRA, 1995) acreditam que a xilose é capaz de estimular a produção de enzimas xilanásicas, promovendo a indução da síntese enzimática. Porém, no caso de glicose não foi feita a mesma observação. Conseqüentemente, neste caso sugere-se que a endo-xilanase gerada por *A. awamori* apresenta um caráter constitutivo.

Quanto à produção de celulase C1, foi possível comprovar que o resultado dos meios compostos por açúcares simples foi superior ao dos que continham as fontes de carbono mais complexas. Diferentemente do resultado anterior, os dados obtidos por alguns autores evidenciaram o aparecimento de níveis baixíssimos desta enzima, e inclusive a sua ausência, durante o cultivo dos respectivos microrganismos em meios de cultura adicionados de xilose e glicose (ROYER & NAKAS, 1989; KADOWAKI *et al.*, 1997).

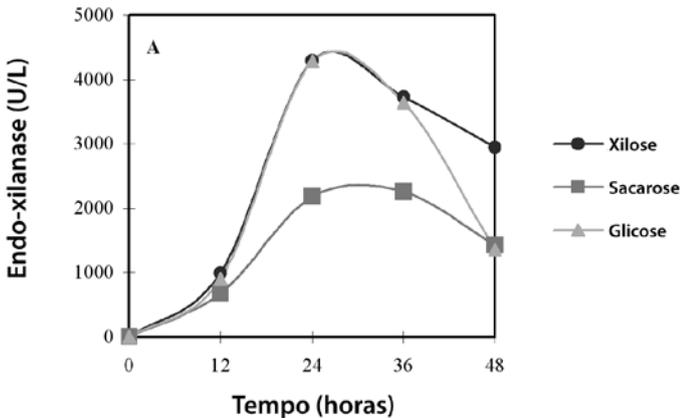


Figura 5.6. Produção de endo-xilanase (A) e celulase C1 (B) por *A. awamori* em meios contendo xilose, glicose e sacarose (16 g/L) como fontes de carbono. O consumo de açúcares e a biomassa estão representados nas figuras (C) e (D), respectivamente.

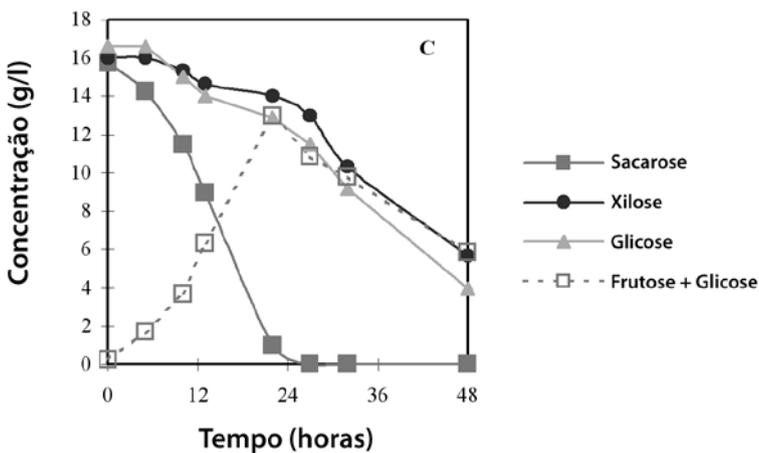
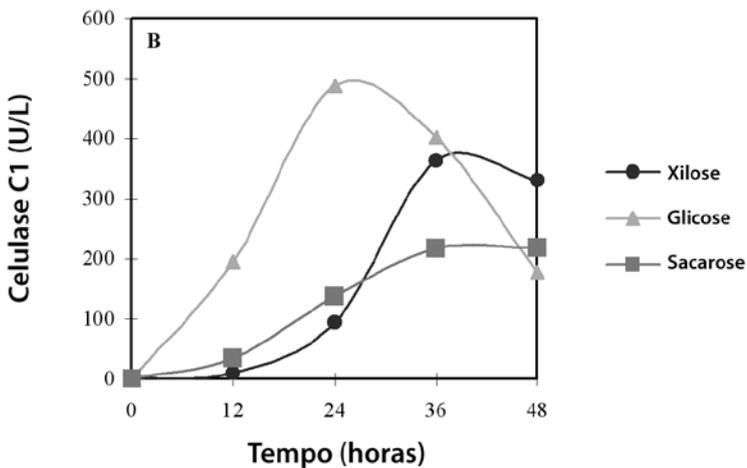


Figura 5.6 (continuação). Produção de endo-xilanase (A) e celulase C1 (B) por *A. awamori* em meios contendo xilose, glicose e sacarose (16 g/L) como fontes de carbono. O consumo de açúcares e a biomassa estão representados nas figuras (C) e (D), respectivamente.

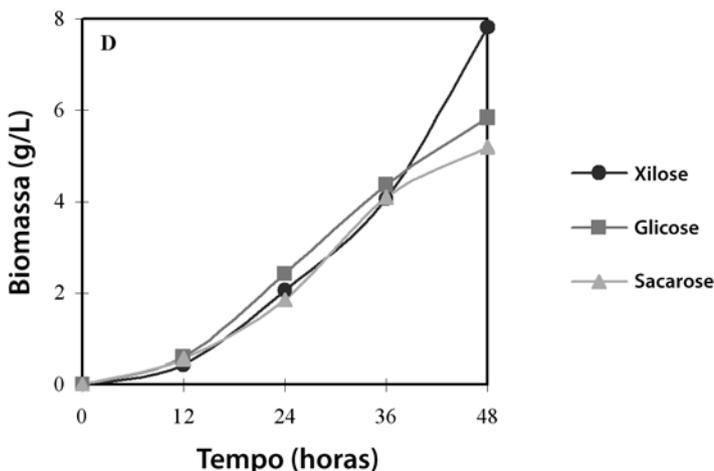


Figura 5.6 (continuação). Produção de endo-xilanase (A) e celulase C1 (B) por *A. awamori* em meios contendo xilose, glicose e sacarose (16 g/L) como fontes de carbono. O consumo de açúcares e a biomassa estão representados nas figuras (C) e (D), respectivamente.

Possivelmente, a menor atividade de endo-xilanase produzida por *A. awamori*, estimada no meio com bagaço de cana, quando comparada àquela obtida com açúcares simples, deve-se a alguma retenção das proteínas no suporte sólido. Visando, então, buscar um maior entendimento a respeito da produção inferior de endo-xilanasas em bagaço de cana, foram efetuadas duas extrações sucessivas utilizando, em cada uma, 100 ml de água destilada para lavar o material lignocelulósico, após a separação do meio (200 ml) em que foi realizada a fermentação. O resultado resume-se na Tabela 5.2.

5.

R
E
S
U
L
T
A
D
O
S

E

D
I
S
C
U
S
S
Ã
O

Tabela 5.2. Avaliação da retenção de endo-xilanase no suporte sólido.

Extração	% extraída
1ª extração (200ml de meio)	100*
2ª extração (100ml de H ₂ O)	30
3ª extração (100ml de H ₂ O)	5

*100% de atividade corresponde a 2100 U/L.

O uso da 2ª e 3ª extrações, posteriores à comumente realizada, pôde comprovar que uma porcentagem da enzima produzida ficava retida no bagaço de cana, possibilitando a recuperação de 30 e 5% da atividade inicial, respectivamente. Estas constatações reforçam a hipótese de que parte da endo-xilanase permanece aderida ao bagaço, subestimando a atividade enzimática; no entanto, mesmo considerando as atividades enzimáticas retidas no suporte, não se atingiram os valores alcançados com os açúcares simples.

6. CONCLUSÕES

1. *A. awamori* NRRL 3112 e *Aspergillus niger* são as linhagens de maior capacidade para produção de xilanases com baixa atividade celulásica.
2. *A. awamori* NRRL 3112 é a linhagem que apresentou maior produtividade volumétrica (75 U/LH) em endo-xilanase e capacidade para produzir quantidades de β -xilosidase ligeiramente superiores às de *A. niger*.
3. O bagaço de cana, finamente cominuído e sem tratamento prévio, foi capaz de sustentar o crescimento de *A. awamori* e induzir a produção de 2000 U/L de endo-xilanase e 1500 U/L de β -xilosidase.
4. O emprego de glicose, xilose e sacarose em fermentações submersas demonstrou o caráter constitutivo das xilanases produzidas por *A. awamori*. Os resultados obtidos a partir das fermentações com açúcares simples permitiram evidenciar um aumento considerável no valor da atividade endo-xilanásica (4842 U/L em xilose, 4277 U/L em glicose e 2259 U/L em sacarose), quando comparada àquela obtida com bagaço de cana (1983 U/L), particularmente em relação à xilose e glicose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelo, R., Aguirre, C., Curotto, E., Esposito, E., Fontana, J.D.F., Baron, M., Milagres, A.M.F. & Durán, N. (1997). Stability and chemical modification of xylanase from *Aspergillus sp.* (2MI strain). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25: 19-27.
- Aurilia, V., Martin, J.C.; Scott, K. P., Mercer, D. K., Johnston, M.E.A. & Flint, H.J. (2000). Organisation and variable incidence of genes concerned with the utilization of xylans in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Anaerobe*, 6: 333-340.
- Bajpai, P. & Bajpai P.K. (1996). Application of xylanases in pre-bleaching of bamboo kraft pulp. *Tappi J.* 79: 225-230.
- Ball, A.S. & McCarthy, A.J. (1988). Saccharification of straw by actinomycetes enzymes. *J. of General Microb.* 134: 2139-2147.
- Bansod, S.M.; Dutta-Choudhary, M.; Srinivasan, M.C. & Rele, M.V. (1993). Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium species*. *Biotechnol. Lett.* 15: 965-970.
- Benier, R.; Desrochers, M.; Jurasek, L. & Paice, M.G. (1983). Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 511-514.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3: 286-290.
- Biswas, S.R.; Mishra, A.K. & Nanda, G. (1988). Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 613-616.
- Bon, E.P.S. (1995). A tecnologia enzimática no Brasil. Em: 2º Seminário brasileiro de tecnologia enzimática - ENZITEC 95, Rio de Janeiro – RJ.
- Chesson, A. & Codner, R.C. (1978). The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 347-364.
- Conn, E.E. & Stumpf, P.K. (1980). Introdução à bioquímica. 4ª edição. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo.

- Costa-Ferreira, M., Dias, A., Máximo, C., Morgado, M.J., Sena-Martins, G. & Duarte, J.C. (1994). Xylanolytic enzyme production by an *Aspergillus niger* isolate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 44: 231-241.
- Couri, S. Terzi, S.C., Pinto, G.A.S., Freitas, S.P. & Costa, C. A. (2000). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochem.* 36: 255-261.
- Dekker, R.F.H. (1983). Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1127-1146.
- Deschamps, A.M.; Comtat, J.; Nouvion, N. & Lebeault, J.M. (1982). Degradation of purified birch-wood xylan and production of xylanase by wood-decaying bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28: 275-280.
- Du Toit, P.J.; Oliver, S.P. & Van Biljon, P.L. (1984). Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. 1. Characterisation of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose and mono acid composition. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1071-1078.
- Craig, B., Faulds, M. C., Ralet, G. W., Geoffrey, Hazlewood, P. & Gilbert, H.J. (1995). Specificity of an esterase (XYLD) from *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1243, Issue 2, 23 February 1995, Pages 265-269.
- Ferreira, O. C. (2003). Avaliação preliminar do potencial de produção de etanol da cana de açúcar. *Economia e Energia.* 34. http://ecen.com/eee34/limites_alcool.htm. Acesso em: março de 2005.
- Forsberg, C.W.; Beveridge, T.J. & Hellstrom, A (1981). Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 886-896.
- Gamerith, G.; Groicher, R, Zellinger, S.; Herzog, P. & Kubicek, C.P. (1992). Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicellulose substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 315-322.

- Ghosh, M.; Das, A.; Mishra, A.K. & Nanda, G. (1993). *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 703-709.
- Gomes, J.; Purkarthofer, H.; Hayn, M.; Kapplmuller, J.; Sinner, M. & Steiner, W. (1993). Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 700-707.
- Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*, 2ª edição. John Wiley & Sons, INC. Publications, New York.
- Gutierrez-Correa, M. & Tengerdy, R.P. (1998). Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnol. Letters.* 20: 45-47.
- Hileman, B.; Long, J.R. & Kirschner, E.M. (1994). Chlorine industry running flat out despite persistent health fears. *Chem. Eng. news.* 21: 12-26.
- Illanes, A. (1994). Situación industrial en producción y utilización de enzimas. In: *Biotecnología de enzimas. Monografía nº 35*, ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. 195-224.
- Jeffries, T.W.; Patel, R.N.; Sykes, M.S. & Klungness, J. (1992). Enzymatic solutions to enhance bonding, bleaching and contaminant removal. *Materials Research Society Symposium.* R.M. Rowell, T.L. Laufenberg, J.K. Rowell, eds. 266: 277-287.
- Johnson, K G.; Harrison, B A.; Schneider, H., Mac Kenzie, C.R. & Fontana, J.D. (1988). Xylan-Hydrolysing enzymes from *Streptomyces spp.* *Enzyme Microb. Technol.* 10: 403-409.
- Kadowaki, M.K.; Pacheco, M.A.C. & Peralta, R.M. (1995). Xylanase production by *Aspergillus* isolates grown on corn cob. *Rev. Microbiol.* 26: 219-223.
- Kadowaki, M.K.; Souza, C.G.M., Simão, R.C.G. & Peralta, R.M. (1997). Xylanase production by *Aspergillus tamarisii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66: 97-106.
- Katagiri, N.; Tsutsumi, Y. & Nishida, T. (1995). Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot

- fungi in the solid-state fermentation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 617-622.
- Kristufek, D., Zeilinger, S. & Kubicek, C.P. (1995). Regulation of β -xylosidase formation by xylose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 713-717.
- Laluce, C. (1991). Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. *Critical Rev. Biotechnol.* 11: 149-161.
- Lee, Y.E.; Lowe, S.E. & Zeikus, I.G. (1993). Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-R1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 763-771.
- Mac Kenzie, C.R.; Bilous, D.; Schneider, H. & Johnson, K.G. (1987). Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2835-2839.
- Matte, A. & Forsberg, C.W. (1992). Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 157-168.
- Milagres, A.M.F., Laci, L.S. & Prade, R.A. (1993). Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellun*. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 248-253.
- Mishra, C.; Keskar, S. & Rao, M. (1984). Production and properties of extracellular endoxylanase from *Neurospora crassa*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 48, 224-228.
- Mudgett, R.E. (1986). Solid-state fermentation. In: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. A. L. Demain & N. A. Solomon. American Society for Microbiology. 66-82.
- Nothenberg, M.S. (1995). ENZITEC discute avanços tecnológicos e mercado. *Química e Derivados.* 22-27: 29-31.
- Novo Nordisk. (1996). A ação das enzimas (Revista informativa).
- Oksanen, T., Pere, J., Paavilainen, L., Buchert, J. & Viikari, L. (2000). Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. *Journal of Biotechnology.* 78:39-48.
- Park, Y.K. (1995). Enzimas industriais - História e perspectivas no Brasil. Em: 2º Seminário brasileiro de tecnologia enzimática - ENZITEC 95, Rio de Janeiro – RJ.

- Patel, R. N., Grabski, A. C. & Jeffries, T. W. (1993). Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 405-412.
- Patiño, J.L.C., Kim, Y.G. & Broda, P. (1993). Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 69-76.
- Pettipher, G. L. & Latham, M.J. (1979). Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *J. Gen. Microbiol.* 110: 21-27.
- Raj, K.C. & Chandra, T.S. (1995). A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *Biotechnol. Lett.* 17: 309-314.
- Royer, J.C. & Nakas, J.P. (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 405-410.
- Royer, J. C. & Nakas, J.P. (1990). Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2535-2539.
- Siedenberg, D., Gerlach, S.R., Schügerl, K., Giuseppin, M.L.F. & Hunik, J. (1998). Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* 33: 429-433.
- Simão, R.C.G., Souza, C.G.M. & Peralta, R.M. (1995). Indução de xilanases de *Aspergillus tamaritii* por β -D-metil-xilosídeo. Em: 2º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 95. Rio de Janeiro – RJ.
- Smith, D.C. & Wood, T.M. (1991). Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and β -xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 883-890.
- Somogyi, M. (1952) . Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. & Sasaki, K. (2003). Optimization of aeration and agitation rates to improve cellu-

lase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95:298-301.

- Wedekind, K.J., Mansfield, H.R. & Montgomery, L. (1988). Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1530-1535.
- Wong, K.K.Y. & Saddler, J.N. (1992). *Trichoderma xylanases*, their properties and application. *Critical Rev Biotechnol.* 12: 413-435.
- Xiong, H., Weymarn, N., Leisola, M. & Turunen, O. (2004). Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Process Biochemistry*, 39:731-736.
- Xiong, H., Nyysölä, A., Jänis, J., Pastinen, O., Weymarn, N., Leisola, M. & Turunen, O. (2004). Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:93-99.