

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JAINA CAROLINE LUNKES

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASE-I
PRODUZIDA POR *Penicillium crustosum* E SUA APLICAÇÃO**

Orientadora: Prof^a Dr^a Marina Kimiko Kadowaki

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**CASCAVEL- PR
2015**

JAINA CAROLINE LUNKES

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASE-I
PRODUZIDA POR *Penicillium crustosum* E SUA APLICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual
do Oeste do Paraná, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marina Kimiko Kadowaki

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**CASCADEL –PR
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L983p	Lunkes, Jaina Caroline Purificação e caracterização bioquímica de xilanase-I produzida por <i>Penicillium crustosum</i> e sua aplicação. / Jaina Caroline Lunkes.— Cascavel, 2015. 48 p. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Maller Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2015 Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas 1. Hemicelulose. 2. Enzimas. 3. Endoxilanase. 4. Indústria alimentícia. I. Kadowaki, Marina Kimiko. II. Maller, Alexandre. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título. CDD 21.ed. 615.10711 CIP-NBR 12899
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

JAINA CAROLINE LUNKES

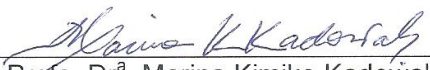
**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASE-I
PRODUZIDA POR *Penicillium crustosum* E SUA APLICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki –
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler –
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR
Banca



Prof^a. Dr^a. Rita de Cassia Garcia Simão
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE
Banca

**CASCADEL – PR
2015**

BIOGRAFIA RESUMIDA

Jaina Caroline Lunkes, filha de Salete Lucia Michelin e João Antônio Lunkes, nasceu em 30 de junho de 1989 na cidade de Toledo no Paraná, junto com sua irmã gêmea Jussara Andréia Lunkes. Graduiu-se em Tecnologia em Biotecnologia pela UFPR – Setor Palotina em 2013, ingressando no Mestrado em Ciências Farmacêuticas logo em seguida. É orientada da Prof.^a Dr.^a Marina Kimiko Kadowaki na linha de pesquisa Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas em saúde, e a previsão de defesa é dezembro de 2015.

Dedico este trabalho a Amália Bonetti Michelin
(*in memoriam*), para sempre minha nona!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que proporcionou todas as coisas, e cuidadosamente preparou meu caminho para chegar até aqui.

Aos meus pais, Salete e João, que muito se esforçaram durante a vida, para ter condições de me apoiar nesse caminho, financeiramente, logisticamente, emocionalmente e de outras maneiras inexplicáveis. Seus esforços nunca cessaram, e aqui estou.

As minha irmã Fernanda e minha gêmea Jussara, que trilharam todos os caminhos possíveis comigo me preparando para essa caminhada, e sempre me estenderam a mão para ajudar dentro e fora das suas possibilidades.

Ao meu namorado Mauro, que bravamente esteve ao meu lado, apoiando, oferecendo ombro, me ajudando com os trabalhos dentro do que ele sabia, e aprendendo o que pode pra me ajudar. Se mostrou um grande companheiro para todas as horas.

A minha orientadora prof.^a Dr^a Marina Kimiko Kadowaki, pelos incontáveis ensinamentos, pela ótima orientação, dedicação extrema e por todas as oportunidades que eu tive e terei sendo sua orientada.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Alexandre Maller, pelos ensinamentos e disposição de ensinar.

Aos meus amigos de graduação que permanecem no meu coração, Maik, Priscila, Gracy, Lais e Fernando, vocês são muito mais do que amigos.

Aos amigos da vida, Yohana, Lucas, Eduardo, Sandra, Juniomar, Liliane, Roger Rafela (cunhada), Guilherme (cunhado), Gustavo (cunhado) e em especial ao Everaldo, uma alma boa que nos deixou tão recente e tão precocemente.

As colegas de mestrado foi um prazer conhece-las e dividir tantas experiências.

Aos colegas de laboratório, Sandra, Vanessa, Juliana, Carla, Laysa, Leticia, Giovane, Débora, Caroline, Amanda, Iara, Felipe e todos os que estiveram lá antes de nós, vocês nunca se limitaram ao papel de colegas, sendo amigos maravilhosos para todas as horas. Sentirei saudades do tempo maravilhoso com vocês.

Aos professores do grupo de Bioquímica em especial ao prof. Dr. José Luís da C. Silva e a prof^a. Dr.^a Rita de C. G. Simão (que compõe a banca examinadora), por sempre estarem dispostos a ajudar com dúvidas, empréstimo de material, e de muitas outras maneiras.

A professora Dr.^a Rita de C. G. Simão e a professora Dr.^a Deisy Drunkler por dedicar seus esforços fazendo parte da banca examinadora.

Aos prof. Dr. Rafael A. Menolli e a prof.^a Dr^a Luciana Bill M. Kottwitz por colaborarem com esta pesquisa.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, PCF.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASE-I PRODUZIDA POR *Penicillium crustosum* E SUA APLICAÇÃO

O complexo xilanolítico é formado por um grupo de enzimas capazes de atuar em vários sítios da cadeia do xilano, uma hemicelulose encontrada na parede celular das plantas, e degradá-lo em xilooligossacarídeos, xilotrioses, xilobioses e xiloses. As endo-1,4- β -xilanases (1,4- β -D-xilano xilanohidrolase; EC 3.2.1.8) que hidrolisam a cadeia principal do xilano de modo aleatório, produzindo uma mistura de xilooligossacarídeos; β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), que hidrolisam apenas cadeias curtas de xilano, liberando xilose; acetil xilano esterases (E.C. 3.1.1.72) que hidrolisam grupos acetato da cadeia principal e a α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), que hidrolisam arabinofuranose das cadeias laterais. Nas últimas décadas, o interesse por xilanases microbianas tem aumentado devido o seu potencial de aplicação biotecnológica, elas têm sido utilizadas em vários setores industriais, incluindo: na suplementação da ração de animais monogástricos, no pré-branqueamento da polpa de papel e celulose, na sacarificação de biomassa lignocelulósica, na indústria têxtil, na panificação e na clarificação de sucos e vinhos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo purificar e caracterizar bioquimicamente a xilanase-I do fungo *Penicillium crustosum* utilizando palha de milho como fonte indutora em cultivo líquido, bem como sua aplicação biotecnológica. A xilanase-I do fungo *P. crustosum* foi purificada a partir do extrato bruto obtido de cultivo líquido estacionário suplementado com palha de milho 2%. Após três colunas cromatográficas (DEAE, CM-Sephadex e coluna de filtração Sephadex G-75) a enzima exibiu homogeneidade e apresentou massa molecular com uma única banda de 23,44 kDa. A xilanase-I exibiu pH ótimo de 5,0 e estabilidade na faixa de pH entre 4,0-7,0. A temperatura ótima da xilanase foi 50 °C, com meia vida de 62 minutos a 50 °C, porém a 40 °C e 45 °C a enzima exibiu meia vida ($T_{1/2}$) de 120 minutos e 74 minutos, respectivamente. Os parâmetros cinéticos para o substrato xilano de *Beechwood* foram K_m de 1,56 mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ 1.000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. Os compostos EDTA e Mn^{2+} aumentaram a atividade xilanásica em 47% e 75%, respectivamente, enquanto que o Na^+ e Ca^{2+} inibiram a ação enzimática em 18% e 22% na concentração de 5 mM. O extrato bruto e a xilanase-I purificada não apresentou efeito citotóxico, consequentemente estes podem ser aplicados na indústria alimentícia. A xilanase-I foi eficaz na clarificação dos sucos de goiaba, pêra e manga resultando em turbidez de 91, 87 e 89% respectivamente em relação ao controle. Assim, a xilanase-I de *P. crustosum* exibiu propriedades interessantes de aplicação para indústria alimentícia, principalmente nos processos de clarificação de sucos.

Palavras-Chave: Hemicelulose, enzimas, endoxilanase, indústria alimentícia.

GENERAL ABSTRACT

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF XILANASE-I PRODUCED BY *Penicillium crustosum* AND ITS APPLICATION

The xylanolytic complex is formed by a group of enzymes capable of acting on multiple binding sites in the chain of xylan, hemicellulose one found in plant cell walls and to degrade it into Xylooligosaccharides, xilotrioses, xilobioses and xylose. The endo-1,4- β -xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8), which hydrolyze the xylan backbone randomly, producing a mixture of xylooligosaccharides; β -xylosidases (EC 3.2.1.37) which hydrolyze only xylan short chains, releasing xylose; Acetyl xylan esterases (EC 3.1.1.72) which hydrolyse acetate groups of the main chain and α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) which hydrolyse arabinofuranose side chains. In recent decades, interest in microbial xylanase has increased because of its potential for biotechnological applications: they have been used in various industrial sectors, including: the supplementation of feed monogastric animals; in the pre-bleaching of pulp and paper pulp; the saccharification of lignocellulosic biomass, in the textile industry, in baking and clarification of juices and wines. In this context, this study aimed to purify and characterize biochemically the xylanase-I of the fungus *Penicillium crustosum* using corn stover as inducer source in liquid culture, and their biotechnological applications. The xylanase-I of *P. crustosum* was purified from the crude extract obtained from stationary liquid culture supplemented with corn stover 2%. After three chromatographic columns (DEAE, CM-Sephadex and filtration column Sephadex G-75) the enzyme exhibited homogeneity and presented a molecular mass of 23.44 kDa single band. The xylanase-I exhibited optimum pH 5.0 and stability in the pH range from 4.0 to 7.0. The optimum temperature of the xylanase was 50 °C, with a half life of 62 minutes at 50 °C, but at 40 °C and 45 °C the enzyme showed half-life ($T_{1/2}$) of 120 minutes and 74 minutes, respectively. The kinetic parameters for the Beechwood xylan substrate K_m was 1.56 mg/mL and V_{max} 1,000 mol/ min / mL. EDTA compounds and Mn^{2+} increased xylanase activity by 47% and 75%, respectively, while Na^+ and Ca^{2+} inhibited the enzyme activity 18% and 22% at a concentration of 5 mM. The crude extract and purified xylanase-I showed no cytotoxic effect, thus they can be applied in the food industry. The xylanase-I was effective in clarifying the guava juice, pear and mango, resulting in turbidity of 91, 87 e 89%, respectively. Therefore, the xylanase-I *P. crustosum* showed relevant properties for application in food industry, especially for clarifying juices process.

Keywords: hemicellulose, enzymes, endoxylanase, food industry

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Parede celular vegetal.....	3
3.1.1 Celulose	3
3.1.2 Hemicelulose	3
3.1.3 Xilano.....	4
3.1.4 Agro-resíduos.....	5
3.2. Complexo xilanolítico.....	6
3.2.1 Xilanase	6
3.2.1.1 Aplicações industriais da xilanase.....	7
3.2.1.2 Panificação.....	7
3.2.1.3 Clarificação de sucos.....	7
3.3 Fungos do gênero <i>Penicillium</i>.....	8
3.3.1 <i>Penicillium crustosum</i>	9
4 REFERÊNCIAS	10
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	16
5.1 Introdução.....	17
5.2 Material e métodos.....	18
5.2.1 Manutenção do fungo e condições de cultivo.....	18
5.2.2 Métodos analíticos.....	19
5.2.3 Caracterização bioquímica da xilanase-I.....	19
5.2.3.1 Purificação da xilanase-I.....	10
5.2.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE, SDS-PAGE e Zimograma..	20

5.2.3.3 Efeito de pH na atividade e na estabilidade enzimática.....	21
5.2.3.4 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática.....	21
5.2.3.5 Efeito de íons e EDTA na atividade xilanásica.....	21
5.2.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	21
5.2.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I purificada de <i>P. crustosum</i>	22
5.2.5 Efeito da xilanase-I na clarificação de sucos.....	22
5.3 Resultados e discussão.....	23
5.3.1 Purificação da xilanase.....	23
5.3.2 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática.....	25
5.3.3 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática.....	26
5.3.4 Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática.....	27
5.3.5 Parâmetros cinéticos.....	29
5.3.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I purificada de <i>P. crustosum</i>	29
5.3.7 Aplicação da xilanase-I na clarificação de sucos.....	30
5.4 Conclusão.....	31
5.5 REFERÊNCIAS	32
ANEXO.....	35

LISTA DE FIGURAS

Revisão

Figura 1	Representação da estrutura da cadeia principal do xilano e seus substituintes.....	5
Figura 2	<i>Penicillium crustosum</i>	10

Artigo

Figura 1	Perfil cromatográfico de purificação da xilanase-I por DEAE-Sephadex e CM-Sephadex.....	24
Figura 2	Perfil cromatográfico de purificação da xilanase-I por Sephadex-G75	24
Figura 3	Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.....	25
Figura 4	Efeito de pH na atividade e estabilidade enzimática.....	26
Figura 5	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	27
Figura 6	Citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I purificada de <i>P. crustosum</i>	30
Figura 7	Aplicação da xilanase-I na clarificação de sucos	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etapas de purificação da xilanase-I produzida por <i>P. crustosum</i>	25
Tabela 2	Efeito de íons sobre a atividade da xilanase-I de <i>P. crustosum</i>	29
Tabela 3	Aplicação da xilanase-I e seu efeito na clarificação de sucos.....	31

1 INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina arranjados em uma arquitetura complexa para a formação de sua estrutura (Tavares e Buckeridge, 2015). Entre estes, a hemicelulose compreende cerca de 33% da massa vegetal seca e o seu principal componente é o xilano (Dhiman *et al*, 2008). A cadeia principal do xilano é composta por resíduos de xilose ligados por ligações glicosídicas β -1,4, que podem ser substituído por outros resíduos (Beg *et al*, 2001).

Para hidrólise completa do xilano, são necessárias diferentes enzimas que compõe o chamado complexo xilanolítico, e entre elas, as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) são responsáveis pela clivagem de ligações glicosídicas no interior da cadeia de β -1,4 xilanos. Como o xilano possui um alto peso molecular, estas enzimas são secretadas e sua atuação ocorre no meio extracelular na maioria dos microrganismos (Polizeli *et al.*, 2005; Chávez *et al*, 2006), e as β -xilosidases que degradam os oligossacarídeos até os monossacarídeos de xilose (Sandrim *et al*, 2005). A produção de xilanase por microrganismos têm sido amplamente estudada nos últimos anos, com destaque para bactérias e fungos, no entanto, os fungos são vantajosos para utilização, pois, tem a habilidade de secretar enzimas para o meio extracelular (Polizelli *et al*, 2005). Dentre os fungos, *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma koningii* têm sido utilizados como fontes industriais de xilanases comerciais (Gírio *et al.*, 2010).

A xilanase possui diversas aplicações industriais, tais como, pré-branqueamento da polpa de papel e celulose, hidrólise da hemicelulose para a produção de etanol e na indústria de alimentos. Nesta última, sua principal aplicação é na panificação e na clarificação de sucos (Dhiman *et al*, 2008).

Entre os fungos produtores de xilanase, o gênero *Penicillium* possui diversos representantes, porém caracterização de xilanase purificada de *Penicillium crustosum* ainda não é encontrada na literatura.

2 OBJETIVO

Purificação e caracterização bioquímica da xilanase extracelular do fungo *Penicillium crustosum* utilizando palha de milho como fonte indutora em cultivo líquido, bem como aplicação biotecnológica da xilanase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é constituída principalmente de carboidratos que representam 75% da matéria seca da planta (Tavares e Buckeridge, 2015). Os três principais polímeros que a compõe são a celulose, a hemicelulose e a lignina (Passarinho, 2014). Juntamente com a pectina, esses polissacarídeos são arranjados em uma arquitetura bastante complexa para a formação da parede celular. Em linhas gerais, a celulose é organizada em microfibrilas e a hemicelulose liga-se não covalentemente a celulose e, esta base, tem um arranjo tridimensional juntamente com a pectina (Koslova *et al*, 2014; Tavares e Buckeridge, 2015).

3.1.1 Celulose

A celulose é composta por monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas do tipo β -1-4, representando de 40 a 45% da massa seca da planta sendo o polímero mais abundante da matéria vegetal e um dos mais abundantes do planeta (Passarinho, 2014; Tavares e Buckeridge, 2015). Este polissacarídeo é renovável, biodegradável, atóxico, estável e de baixo custo, características que o tornam extremamente interessante e importante industrialmente (Miao *et al*, 2015). Devido a essas características, a celulose possui diversas aplicações biotecnológicas e industriais, como na indústria de papel, na produção de medicamentos, plásticos, cosméticos e na produção de etanol a partir da hidrólise dos açúcares (Miao *et al*, 2015; Yang *et al*, 2015; Sun, 2002).

3.1.2 Hemicelulose

Hemicelulose é um heteropolímero presente em toda a célula vegetal, mas encontra-se principalmente na parede primária e secundária, fortemente associada a celulose e lignina (Beg *et al*, 2001; Dhiman *et al*, 2008). Pode ser composta de pentoses (xilose, ramnose e arabinose) e hexoses (galactose, manose e glicose), mas, a sua composição química varia muito entre diferentes espécies vegetais e diferentes estágios de desenvolvimento da planta (Passarinho, 2015). Em razão

disso, a classificação da hemicelulose depende do açúcar que estiver mais presente (Beg *et al*, 2001; Dhiman *et al*, 2008).

Encontram-se muitos estudos buscando a hidrólise da hemicelulose objetivando manter a integridade da celulose (Sharma *et al*, 2010; Polizeli *et al*, 2005). Para essa finalidade, Sun (2002) descreveu métodos físicos: trituração mecânica e pirólise; físico-químicos: explosão de vapor ou auto-hidrólise, explosão de fibra de amônia e explosão de CO₂; químicos: ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo organosolv; e biológicos: utilização de enzimas de microrganismos que degradam a hemicelulose.

Ainda, segundo Sun (2002), a complexidade de associação da hemicelulose com a celulose, faz com que, muitas vezes, mais de um método necessite ser empregado para a remoção completa da hemicelulose.

3.1.3 Xilano

O xilano é muito importante como reserva de carbono, a exemplo da madeira de bétula, o qual representa 35% da massa seca (Wong *et al*, 1988). Sua cadeia principal é composta por resíduos de xilose ligados por ligações glicosídicas β -1-4 (Beg *et al*, 2001) (Figura 1). No entanto, dependendo de sua origem vegetal, podem ser classificados de acordo com a composição de resíduos como: glucuronoxilano, arabino glucuronoxilano, glucomananas, arabinogalactanos e galactoglucomanas (Beg *et al*, 2001; Polizeli *et al*, 2005; Collins *et al*, 2005;). Ainda, no estudo de Kulkarni e colaboradores (1999) foi demonstrado a presença de pequenas quantidades de ácido ferúlico e *p*-cumárico ligados aos resíduos de L-arabinose.

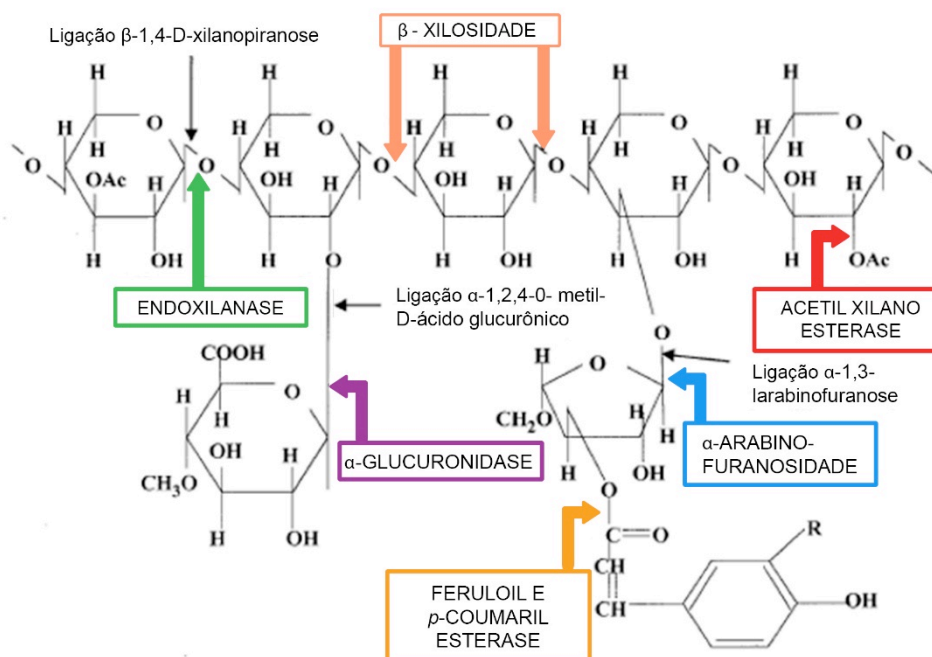


Figura 1 Representação da estrutura da cadeia principal do xilano e seus substituintes, bem como do local de ação de cada uma das enzimas do complexo xilanolítico (Beg *et al*, 2001).

3.1.4 Agro-resíduos

Agro-resíduos são uma importante fonte de biomassa lignocelulósica. A hemicelulose presente nestes resíduos são recursos renováveis que podem ser utilizadas por microrganismos para produção enzimática e resultar na produção de combustíveis (Paës *et al*, 2012). A utilização destes resíduos para a produção de etanol começa a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose (Alvira, 2010). Além disso, a degradação por microrganismos do xilano contido nestes resíduos pode ser utilizada para a produção de xilooligossacarídeos (Kumar e Satyanarayana, 2014).

Os agro-resíduos estudados como fonte de carbono, para cultivo de microrganismos degradadores de celulose e hemicelulose são diversos. Há estudos com palha de milho, sabugo de milho, farelo de trigo, gérmen de trigo, sêmola de aveia, sorgo, farelo de aveia, bagaço de cervejaria, casca de beterraba, entre outros. (Kocabas *et al*, 2015; Mushimiyimana e Tallapragada, 2015; McPhillips *et al*, 2014; Knob *et al*, 2013; Shah *et al*, 2006).

3.2 Complexo xilanolítico

A heterogeneidade da estrutura do xilano exige um arsenal de enzimas para hidrolisar completamente a sua estrutura (Beg *et al*, 2001). Estas enzimas são: xilanases (E.C. 3.2.1.8) que hidrolisam a cadeia principal do xilano de modo aleatório, produzindo uma mistura de xilooligossacarídeos; β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), que hidrolisam apenas cadeias curtas de xilano, liberando xilose; acetil xilano esterases (E.C. 3.1.1.72) que hidrolisam grupos acetato da cadeia principal; α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), que hidrolisam arabinofuranose das cadeias laterais; α -D-glucuronidases (E.C. 3.2.1.139), que hidrolisam os resíduos de metil glucuronato, e ainda, feruloil (E.C. 3.1.1.73) e cumaril esterases (E.C. 3.1.1) que hidrolisam os respectivos resíduos ligados a grupos arabinofuranosídeos. (Dhiman *et al*, 2008; Chávez *et al*, 2006). Todas estas enzimas agem cooperativamente para hidrolisar o xilano em monômeros menores (Figura 1). Dentro deste complexo, as enzimas mais estudadas são as endoxilanases e as β -xilosidades (Polizeli *et al*, 2005).

3.2.1 Xilanase

O nome oficial da xilanase é endo-1,4- β -xilanase, porém, são sinônimos xilanase, endoxilanase, 1,4- β -D-xilanohidrolase, endo-1,4- β -D-xilanase, 1,4- β -xilanase e β -xilanase (Collins *et al*, 2005). A produção desta enzima por microrganismos tem sido amplamente estudada nas últimas décadas (Biely, 1985, Dhiman *et al*, 2008). As principais fontes têm sido bactérias, protozoários, algas, fungos, entre outros (Collins *et al*, 2005). Dentre estes, os microrganismos mais estudados são as bactérias e os fungos (Kocabas *et al*, 2015). Os fungos, no entanto, são organismos com a habilidade de secretar as enzimas para o meio extracelular e tal característica é vantajosa industrialmente, pois, diminui potencialmente etapas de produção enzimática. (Kocabas *et al*, 2015; Polizeli *et al*, 2005).

3.2.1.1 Aplicações industriais da xilanase

Xilanases tem uma vasta aplicação industrial, entre elas a suplementação da ração de animais monogástricos, na panificação, clarificação de sucos, na indústria têxtil e no branqueamento da polpa de papel e celulose (Polizeli *et al*, 2005). Na sociedade atual, as necessidades e as preferências alimentares são diferentes das sociedades pré-revolução industrial, neste sentido, o uso da xilanase em produtos alimentícios tem aumentado nos últimos anos (Shah *et al*, 2006).

3.2.1.2 Panificação

Xilanases são largamente utilizadas na indústria de panificação em preparações enzimáticas comerciais (Beg *et al*, 2001; Shah *et al*, 2006). Segundo Elgharbi e colaboradores (2015) a adição de xilanase na massa do pão durante a sua preparação, melhora as propriedades reológicas da massa, volume específico do pão e a firmeza do miolo. O uso de xilanase com características apropriadas para a panificação tem a capacidade de transformar arabinoxilanos insolúveis presentes na farinha de trigo para a sua forma solúvel (Elgharbi *et al*, 2015; McPhillips *et al*, 2014). Essa característica ajuda a melhorar a formação de redes de glúten essenciais na panificação (McPhillips *et al*, 2014). Os mesmos autores relataram ainda que a xilanase purificada de *Remersonia thermophila* foi essencial na panificação, conferindo ao pão aumento da massa, aumento da maciez do miolo e aumento do tempo de armazenamento em prateleira. Similarmente, Elgharbi e colaboradores (2015) obtiveram aumento no crescimento e no volume da massa de pão acrescido da xilanase clonada de *Aspergillus niger* em *Pichia pastoris*.

3.2.1.3 Clarificação de sucos

O processamento industrial de sucos de frutas, várias propriedades são importantes, dentre elas cor, sabor, aparências e tempo de armazenamento em prateleira. Porém, com a trituração das frutas, ocorre naturalmente o rompimento da parede celular liberando pectina, celulose, hemicelulose e lignina que ficam suspensos no suco aumentando a turbidez, além disso, durante o armazenamento do suco esses componentes levam a precipitação de sólidos (Garg *et al*, 2010,

Dhiman *et al*, 2011; Diáz *et al*, 2013). A turbidez dos sucos desfavorece o comércio, tornando importante o processo de clarificação (Dhiman *et al*, 2011, Diáz *et al*, 2013; Sharma e Kumar, 2013). No processo de clarificação de sucos, a etapa de adição de enzimas é importante, pois elas aumentam o rendimento dos sucos (Dhiman *et al*, 2011).

Na grande maioria dos processos de clarificação de sucos são realizados com a adição de pectinase, poucos são os relatos do uso de xilanase.

Bajaj e Manhas (2012) que purificaram duas xilanases produzidas por *Bacillus licheniformis* P11(C) e utilizaram na clarificação dos sucos de abacaxi, mousambi (uma fruta cítrica típica da Índia) e maçã e testaram também na panificação e obtiveram resultados relevantes. Ainda, Dhiman e colaboradores (2011) descrevem sobre o potencial da xilanase produzida por *Bacillus stearothermophilus* na clarificação de suco cítrico utilizando delineamento experimental.

Portanto, a busca por novos microrganismos produtores de xilanase que apresentam características de interesse para fins industriais tem sido alvo de extensas pesquisas (Savitha *et al*, 2009). Entre esses microrganismos, estão fungos do gênero *Penicillium* (Chávez *et al*, 2006).

2.6 Fungos do gênero *Penicillium*

Fungos do gênero *Penicillium* são comumente encontrados em vários ambientes terrestres. Em ambientes naturais, são oportunistas e versáteis sendo, na maioria dos casos, saprofíticos (Li e Zong, 2010). Sua principal função na natureza é a decomposição de compostos orgânicos, sendo esses fungos os principais patógenos de frutas e vegetais (Visagie, *et al*, 2014). Por outro lado, cepas selecionadas de *P. roqueforti* têm sido utilizadas na fabricação de queijos e essa espécie é a principal responsável pela aparência azul de alguns tipos de queijos (Fontaine, *et al*, 2015). A mais notável descoberta dentre os fungos do gênero *Penicillium* foi o antibiótico penicilina por Alexander Fleming (1929) e produzida por *P. notatum*. Por isso, fungos desse gênero ainda são estudados, na busca de novos antibióticos (Koetsier *et al*, 2010).

Segundo Visagie e colaboradores (2014) a denominação do gênero *Penicillium* foi introduzido por Link em 1809 e significa “vassoura”, desde então, diversos estudos de elucidação da nomenclatura dos fungos em nível de espécie

foram realizados, principalmente por meio de estudos morfológicos. Em 2004, Frisvad e Samson propuseram um guia para a diferenciação dos fungos desse gênero e dos seus metabólitos. Entretanto, ferramentas de biologia molecular estão substituindo os métodos de análise morfológica dos fungos (Visagie *et al*, 2014).

Estudo com enzimas do complexo xilanolítico produzido por fungos deste gênero tem sido relatado ao longo dos anos. Krogh e colaboradores (2004) realizaram um dos primeiros relatos sobre enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por este gênero de fungos. Posteriormente, Chávez e colaboradores (2006), relataram que fungos do gênero *Penicillium* constituem uma fonte rica de enzimas degradadores de xilano.

3.3.1 *Penicillium crustosum*

O fungo *Penicillium crustosum* (Figura 2) foi reportado pela primeira vez por Thom em 1930 (Sonjak *et al*, 2005), desde então é possível encontrar estudos denominando o fungo como *Penicillium crustosum* Thom (Yamaguchi *et al*, 1993; Rundberget e Wilkins 2002). Sonjak e colaboradores (2005) relatam que este fungo pode ser encontrado como um subtipo do fungo *P. expansum*. No intuito de esclarecer as diferenças entre as espécies do gênero *Penicillium*, Frisvad e Samson (2004), realizaram um estudo minucioso sobre a morfologia e a presença de metabólitos secundários como penitreno A, ácido ciclopiazônico, nefrotoxina citrinina, roquefortina C e penicilina. Ainda, a denominação de espécie *crustosum*, deve-se pela característica dos conídios formarem um aspecto de crosta em colônias com cultivo após sete dias ou mais (Frisvad e Samson, 2004).

Desde o relato da primeira descrição morfológica do *P. crustosum* os principais estudos tem sido relativos aos seus metabólitos secundários como os penitrenos A-F (Maes *et al*, 1982; El-Bann e Leistner, 1988; Yamagushi *et al*, 1992; Rundberget e Wilkins, 2002). Outro metabólito secundário produzido pelo *P. crustosum* estudado foi a roquefortina C, encontrada em outros fungos do mesmo gênero (Trimble *et al*, 2012; Fontaine, *et al*, 2015). Ainda, Cabeza e colaboradores (1999) identificaram a produção de 5 α -redutase por *P. crustosum*, esta enzima foi encontrada em mamíferos é responsável pela conversão da testosterona em diidrosterona.

A produção de xilanase por *P. crustosum* foi relatada pela primeira vez por Mushimiyimana e Tallapragada (2015). Eles otimizaram a produção de xilanase utilizando casca de beterraba como fonte de carbono em cultivo líquido submerso.

A purificação de xilanases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* são estudadas há muito tempo, no entanto, não foram encontrados ainda relatos das propriedades bioquímicas de xilanase produzida por *P. crustosum*.



Figura 2 Representação do conidióforo e conídios de *P. crustosum* (A); massa conídial de *P. crustosum* (Frisvad e Samson, 2004) (B); Estrutura morfológica esporulada de *P. crustosum* (Lewis et al, 2005) (C).

4 REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 330-337, 2012.
- BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol Biotechnol*, v. 56, p. 326-338. 2001.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, v. 3, p. 286-290, 1985.
- CABEZA, M. S.; GUTIERRES, E. B.; GARCIA, G. A.; AVALOS, A. H.; HERNANDEZ, M. A. H. Microbial transformations of testosterone to 5 α -dihydrotestosterone by two species of *Penicillium*: *P. chrysogenum* and *P. crustosum*. *Steroids*, v. 64, p. 379–384, 1999.

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 413-433, 2006.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 3-23, 2005.

DÍAZ, A. B.; ALVARADO, O.; ORYA, I.; CAROA, I.; BLANDINO, A. Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 580-586, 2013.

DHIMAN, S. S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R.; METHOXY. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. *New Biotechnology*, v. 28, p. 746-755, 2011.

DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BATTAM, B. Industrial Applications and Future Prospects of Microbial Xylanase: a Review. *Biosources*, v. 3, p. 1377-1402, 2008.

DU, Y.; SHI, P.; HUANG, H.; ZHANG, X.; LUO, H.; WANG, Y.; YAO, B. Characterization of three novel thermophilic xylanases from *Humicola insolens* Y1 with application potentials in the brewing industry. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 161-167, 2013.

EI-BANNA, A.A.; LEISTNER, L. Production of penitrem A by *Penicillium crustosum* isolated from foodstuffs. *International journal of Food Microbiology*, v. 7, p. 9-17, 1988.

ELGHARBI, F.; HMIDA-SAYARI, A.; ZAAFOURI, Y.; BEJAR, S. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion International. *Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 103-109, 2015.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of B. Influenza. *The British Journal of Experimental. Pathology*, v. 10, p. 226-236, 1929.

FONTAINE, K.; PASSERO, E.; VALLONE, L.; HYMERY, N.; COTON, M.; JANY, J.; MOUNIER, J.; COTON, E. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control*, v. 47, p. 634-640, 2015.

FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A.; Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne *terverticillate Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 49, p. 1-52, 2004.

GARG, N.; MAHATMAN, K. K.; KUMAR, A. Xylanase: Applications and Biotechnological Aspects. *Lambert Academic Publishing*, AGCo. KG, Germany, 2010.

GÍRIO, F. M.; FONSECA C.; CARVALHEIRO F.; DUARTE L. C.; MARQUES S.; BOGEL-LUKASIK R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 115, p. 66-75, 2015.

KOETSIER, M. J.; GOMBERT, A. K.; FEKKEN, S.; BOVENBERG, R. A. L.; VAN DEN BERG, M. A.; KIEL, J. A. K. W.; JEKEL, P. A.; JANSSEN, D. B.; PRONK, J. T.; VAN DER KLEI, I. J.; DARAN, J. The *Penicillium chrysogenum* *aclA* gene encodes a broad-substrate-specificity acyl-coenzyme A ligase involved in activation of adipic acid, a side-chain precursor for cephem antibiotics. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 33-42, 2010.

KOZLOVA, L. V.; AGEEVA, M. V.; IBRAGIMOVA, N. N.; GORSHKOVA T. A. Arrangement of mixed-linkage glucan and glucuronoarabinoxylan in the cell walls of growing maize roots. *Annals of Botany*, v. 114, p. 1135-1145, 2014.

KROGH, K.B.R., MØRKEBERG, A., JØRGENSEN, H., FRISVAD, J.H.C., OLSSON, L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.114, p. 389-401, 2004.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Review*, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Secretion of recombinant thermo-alkali-stable endoxylanase of polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1 and its utility in generating xylooligosaccharides from renewable agro-residues. *Process Biochemistry*, v. 49, p. 1875–1883, 2014.

LEWIS, P. R.; DONOGHUE, M. B.; HOCKING, A. D. COOK, L.; GRANGER, L. V. Tremor syndrome associated with a fungal toxin: sequelae of food contamination. *MJA, Notable Cases*, v. 182, p. 582-584, 2005.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 43-54, 2010.

MAES, C. M.; STEYN, P. S.; VAN HEERDEN, F. R. High-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography of penitrems A-F, tremorgenic mycotoxins from *Penicillium crustosum*. *Journal of Chromatography*, v. 234, p. 489-493, 1982.

McPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and Characterisation of a β -1,4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 172, p. 1747-1762, 2013.

MIAO, X, LIN, J., TIAN, F., LI, X., BIAN, F., WANG, J. Cellulose nanofibrils extracted from the byproduct of cotton plant. *Carbohydrate polymers*, v. 136, p. 141-150, 2015.

MUSHIMIYIMANA, I.; TALLAPRAGDA, P. Statistical Optimization of Cellulase and Xylanase Enzyme Production by *Penicillium Crustosum* Using Sugar Beet Peel Substrate by Response Surface Methodology. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 6, p. 1144-1151, 2015.

PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 564-592, 2012.

PASSARINHO, A. T. P., *Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xyna de orpinomyces pc-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de sucos*. 2014. 61 f. Tese, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Brazil, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRATTER, S.M., EIXELSBERGER, T., NIDETZKY B. Systematic strain construction and process development: Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Candida tenuis* xylose reductase in wild-type or mutant form. *Bioresource Technology*, v. 198. p. 732-738, 2015.

RUNDBERG, T.; WILKINS, A. L. Thomitrems A and E, two indole-alkaloid isoprenoids from *Penicillium crustosum* Thom. *Phytochemistry*, v. 61, p. 979-985, 2002.

SAHA, S. P.; GHOSH, S. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, p.188-196, 2014.

SANDRIM V. C.; RIZZATTI A. C. S.; TERENCE H. F.; JORGE J. A.; MILAGRES A. M. F.; POLIZELI M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

SAVITHA, S., SADHASIVAN, S. SWAMINATHAN, K. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 883-889, 2009.

SHARMA, M., CHADHA, B. S., SAINI, H. S. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8834-8842, 2010.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: na overview. *British Biotechnology Journal*, v. 3, p. 1-28, 2013

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 53, p. 51-60, 2005.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAVARES, E. Q.P., BUCKERIDGE, M. S. Do plant cell walls have a code? *Plant Cience*, v. 241, p. 886-294, 2015.

TRIMBLE, L. A.; SUMARAH, M. A; BLACKWELL, B. A.; WRONA, M. D.; MILLER, J. D. Characterization of (16R) and (16S)-hydroxyroquefortine C; diastereomeric metabolites from *Penicillium crustosum* DAOM 215343. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 956-958, 2012.

VISAGIE, C.M.; HIROOKA, Y.; TANNEY, J.B.; WHITFIELD, E.; MWANGE, K.; MEIJER, M.; AMEND3, A.S.; SEIFERT, K.A.; SAMSON, R.A. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, v. 78, p. 63-139, 2014.

WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER J. N. Multiplicity of 3-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, v. 52, p. 305-317, 1988.

YANG, X., XU, M., YANG, S. Metabolic and process engineering of *Clostridium cellulovorans* for biofuel production from cellulose. *Metabolic Engineering*, v. 32, p.39-48, 2015.

YAMAGUSHI, T.; NOZAWA, K.; HOSOE, T.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K. Indoloditerpenes related to tremorgenic mycotoxins, penitrems, from *Penicillium crustosum*. *Phytochemistry*, Vol. 32, No. 5, PP. 1177- 1181, 1993

ZHANG, Q.; ZHANG, P.; PEI, Z.J.; XU, F.; Wang D.; Vadlani, P. Effects of ultrasonic vibration-assisted pelleting on chemical composition and sugar yield of corn stover and sorghum stalk. *Renewable Energy*, v. 76, p. 160-166, 2015.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE XILANASE-I PRODUZIDA POR *Penicillium crustosum* E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Resumo

Este estudo teve como objetivo purificar e caracterizar a xilanase-I extracelular de *P. crustosum* e avaliar seu potencial na clarificação de sucos. A xilanase foi purificada utilizando colunas cromatográficas (DEAE, CM-Sephadex e coluna de filtração Sephadex G-75) e obteve-se um rendimento de 0,06% com fator de purificação de 22,18 vezes. A enzima exibiu homogeneidade após três colunas cromatográficas e apresentou massa molecular com uma única banca de 23,44 kDa. A xilanase exibiu pH ótimo de 5,0 e estabilidade ao pH entre 4,0-7,0. A temperatura ótima da xilanase foi 50 °C, com meia vida de 62 minutos a 50 °C, porém a 40 °C e 45°C a enzima exibiu meia vida ($T_{1/2}$) de 120 minutos e 74 minutos, respectivamente. Os parâmetros cinéticos para o substrato xilano de *Beechwood* foram K_m de 1,56 mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ 1.000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. Os compostos EDTA e Mn^{2+} aumentaram a atividade xilanásica em 47% e 75%, respectivamente, enquanto que o Na^+ e Ca^{2+} inibiram a ação enzimática em 18% e 22% na concentração de 5 mM. O extrato bruto e a xilanase-I purificada não apresentou efeito citotóxico, consequentemente estes podem ser aplicados na indústria alimentícia. A xilanase-I foi eficaz na clarificação dos sucos de goiaba, pêra e manga, diminuindo a turbidez em 91, 87 e 89% em relação ao controle. Portanto, a xilanase de *P. crustosum* exibiu propriedades interessantes com potencial para aplicação na indústria alimentícia, principalmente nos processos de clarificação de sucos.

Palavras-chave: Endoxilanase, enzimas, fungos filamentosos, indústria alimentícia

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF XILANASE-I PRODUCED BY *Penicillium crustosum* AND ITS BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

Abstract

This study aimed to purify, characterize the extracellular xylanase from *P. crustosum* and evaluate its potential for clarification of juices. The xylanase was purified using chromatographic columns (DEAE, CM-Sephadex and filtration column Sephadex G-75) and obtained in a yield of 0.06% with a 22.18 fold purification factor. The enzyme exhibited homogeneity after three chromatographic columns and showed single band of protein with molecular mass of 23.44 kDa. The xylanase exhibited optimum pH 5.0 and stability pH between 4.0 to 7.0. The optimum temperature of the xylanase was 50 °C, the enzyme showed a half-life of 62 min at 50 °C, but at 40 °C and 45 °C the enzyme showed half-life ($T_{1/2}$) of 120 min and 74 min, respectively. The kinetic parameters for the beechwood xylan substrate were K_m 1.56 mg/mL and V_{max} 1.000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. EDTA compound and Mn^{2+} increased xylanase activity by 47% and 75%, respectively, while Na^+ and Ca^{2+} inhibited the enzyme activity in 18% and 22% at 5mM. The crude extract and purified xylanase-I showed no cytotoxic effect, thus it can be applied in the food industry. The xylanase-I was effective in clarifying the guava, pear and mango juices, reducing turbidity in 91, 89 and 87% compared to control. Therefore, the xylanase from *P. crustosum* exhibited interesting properties with potential for application in the food industry, especially in juice clarification processes.

Keywords: Endoxylanase, enzymes, filamentous fungus, food industry

5.1 Introdução

Xilano é um polissacarídeo heterogêneo que consiste de uma cadeia principal de resíduos xilopiranosídicos unidos através de ligações β -1,4 e ramificações laterais curtas (Bajaj e Manhas, 2012). Os substituintes mais frequentes que compõem as ramificações são resíduos arabinosil, manosil, galactosil, acetil e glucuronosil, dando origem aos arabinoxilanos, glucuronoxilanos e glucuronoarabinoxilanos (Polizeli *et al*, 2005). Este polímero é o maior componente da hemicelulose e o segundo polissacarídeo em maior abundância na natureza (Collins *et al*, 2005).

Devido à complexidade da estrutura do xilano um arsenal de enzimas é necessário para sua completa hidrólise (Beg *et al*, 2001). Essas enzimas são denominadas de endoxilanases (E.C. 3.2.1.8), β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), acetil xilano esterases (E.C. 3.1.1.72), α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), α -D-glucuronidases (E.C. 3.2.1.139), feruloil (E.C. 3.1.1.73) e coumaril esterases (E.C. 3.1.1.-) (Chávez *et al*, 2006). As endoxilanases desempenham um papel importante, pois clivam as ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal do xilano produzindo xilooligossacarídeos (Polizeli *et al*, 2005).

Diversos organismos encontrados na natureza são produtores das xilanases, entre eles estão as bactérias, protozoários, algas e fungos (Collins *et al*, 2005). Porém, entre os microrganismos, os fungos destacam-se como potenciais produtores de biocatalisadores em larga escala e também por secretar as enzimas para o meio extracelular (Polizeli *et al*, 2005; Kocabas *et al*, 2015). Entre fungos mesófilos, os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais eficientes produtores de enzimas xilanolíticas de aplicação industrial (Romanowska *et al*, 2006). Nas últimas décadas, o interesse por xilanases microbianas tem aumentado devido o seu potencial de aplicação biotecnológica, elas têm sido utilizadas em vários setores industriais, incluindo: na suplementação da ração de animais monogástricos, no pré-branqueamento da polpa de papel e celulose, na sacarificação de biomassa lignocelulósica, na indústria têxtil e na panificação (Polizeli *et al*, 2005).

Além disso, as enzimas xilanolíticas juntamente com as celulasas, amilases e pectinases, têm sido utilizadas na clarificação de sucos de frutas, vinhos e mosto, estabilização das polpas de frutas, na recuperação de aromas, óleos essenciais, vitaminas, sais minerais, pigmentos e corantes comestíveis, na redução da

viscosidade e na liquefação de frutas e vegetais (Polizeli *et al*, 2005; Dobrev *et al*, 2007). Na produção de cervejas, a xilanase é aplicada para melhorar a filtração e reduzir a turbidez do produto final (Dobrev *et al*, 2007). Portanto, o conhecimento das propriedades enzimáticas para aplicação futura de xilanases em indústrias alimentícias são importantes, e determinar todas as características bioquímicas dentre elas a atividade ótima de pH, temperatura, bem como estabilidade nas condições ótimas de reação enzimática. Dentro desse contexto, este estudo teve como propósito investigar a xilanase produzida por um fungo mesófilo dotada de características enzimáticas favoráveis para aplicação industrial. Assim, purificação e caracterização bioquímica da xilanase extracelular produzida por *Penicillium crustosum* e avaliação do seu potencial na clarificação de sucos foi realizada.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Manutenção do fungo e condições de cultivo

O fungo *P. crustosum* utilizado neste estudo foi previamente isolado da Mata Atlântica do Oeste do Paraná através do projeto Sisbiota. A sequência da região de ITS1 a ITS4 do fungo *P. crustosum* se encontra depositada com número de acesso KM065878 no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A manutenção do fungo foi realizada em tubos de ensaio contendo meio agar-batata-dextrose (PDA) inclinados, mantidos sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) por até um mês. O cultivo líquido foi feito a partir da suspensão dos esporos em água destilada estéril (10^5 esporos mL^{-1}) e inoculados em frascos de erlenmeyer (125 mL), contendo 25 mL do meio mineral Czapek suplementado com 2% de palha de milho (p/v). O cultivo foi desenvolvido em incubadora refrigerada (B.O.D., TE-371) a $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ em condições estacionárias por 6 dias. O extrato bruto foi obtido por filtração do meio de cultivo utilizando funil de Büchner com o auxílio de bomba vácuo. O extrato enzimático foi submetido a centrifugação por 5 minutos a $1.200 \times g$ em centrífuga clínica em temperatura ambiente e o sobrenadante obtido foi dialisado contra água deionizada por 16 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo este utilizado para a dosagem enzimática e procedimentos de purificação. Os procedimentos descritos acima foram previamente padronizados por trabalhos anteriores realizados no laboratório.

5.2.2 Métodos analíticos

A atividade enzimática da xilanase foi determinada por meio de análise da liberação de açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com o substrato xilano pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A reação enzimática foi constituída de 200 μL de xilano de *beechwood* (Sigma-Aldrich) 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, e 200 μL da enzima. A reação foi incubada em banho maria a 50 °C, após 10 minutos alíquotas de 100 μL foram retiradas e adicionadas em tubos contendo 100 μL de DNS. Em seguida, os tubos foram incubados em banho fervente por cinco minutos e adicionado 1 mL de água destilada por tubo. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm contra um branco, o qual não apresenta a presença da enzima. Todos os ensaios de dosagens enzimáticas foram realizados em triplicata. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de micromoles de xilose liberados por 1 mL em 1 minuto (U mL^{-1}) nas condições de ensaio.

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando soroalbumina bovina como padrão. Nos processos de purificação da enzima a proteína foi dosada utilizando leitura com espectrofotômetro A_{280} .

5.2.3 Caracterização bioquímica da xilanase-I

5.2.3.1 Purificação da xilanase-I

O extrato bruto enzimático foi aplicado na coluna de troca iônica DEAE-Sephadex (2 x 20 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Frações de 5 mL foram coletados em tubos com fluxo de 1,3 mL minuto^{-1} utilizando o mesmo tampão para eluição, em seguida as amostras foram monitoradas quanto a proteína (A_{280}) e atividade enzimática. As frações contendo atividade enzimática que não aderiram à coluna DEAE-Sephadex foram denominadas de xilanase-I. Estas foram reunidas, dialisadas contra água deionizada por 16 horas a 4 °C e aplicadas em uma segunda coluna de troca iônica a CM-Sephadex (2 x 20 cm) equilibrada com tampão citrato de sódio 0,02 M pH 4,5. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e gradiente linear de NaCl nas concentrações de 0,05-0,9 M. Frações de 7,5 mL tubo^{-1} foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL minuto^{-1} e avaliadas quanto a

proteína (A_{280}) e atividade enzimática. Então, frações com atividade enzimática foram reunidas, dialisadas contra água deionizada por 16 horas a 4 °C e concentradas por liofilização até um volume aproximado de 500 μ L. Essa amostra concentrada foi aplicada na coluna de gel filtração Sephadex G-75 (2 x 70 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,5. Frações de 1,5 mL tubo⁻¹ foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL minuto⁻¹. As frações com atividade enzimáticas foram reunidas, dialisadas contra água deionizada por 16 horas a 4 °C e concentradas por liofilização para posterior análise e caracterização bioquímica da enzima.

5.2.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE, SDS-PAGE e Zimograma

O grau de purificação da enzima foi avaliado por eletroforese em condições desnaturantes com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme método descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado na concentração de 10% de acrilamida, e a corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 40 mA e 120V. A coloração do gel foi realizada por nitrato de prata (Blum *et al*, 1988). Os marcadores de massa molecular eram compostos de: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor da tripsina (21,1kDa) e α -lactoalbumina (14,1kDa) (SDS-LMW GE Healthcare). A massa molecular da xilanase foi estimada através do coeficiente de migração da proteína em relação aos padrões (R_f). Este foi obtido através de um cálculo utilizando-se da migração entre a proteína e o fronte azul de bromofenol.

O zimograma foi realizado por eletroforese em condição não desnaturante (PAGE) para proteínas básicas conforme metodologia descrita por Reinsfeld (1962). Após a corrida eletroforética, o gel foi submerso em 0,5% (p/v) de xilano de *beechwood* em 50 mM de tampão citrato de sódio, pH 5,0 e incubou-se a 50 °C durante 30 minutos. O gel foi corado com uma solução de vermelho Congo (0,2%, p/v) durante 10 minutos à temperatura ambiente e descorado com 2 M de solução de NaCl até a visualização da banda de atividade enzimática

5.2.3.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

A influencia do pH na atividade enzimática foi determinada incubando a enzima em tampão McIlvaine 0,1 M em diferentes pH de 3,0 a 7,0 e verificando posteriormente a atividade enzimática. A estabilidade ao pH foi analisada incubando a enzima em tampão McIlvaine na faixa de pH 4,0 a 7,0 a 4 °C, avaliando a atividade enzimática residual em intervalos de tempo de 0 até 72 horas.

5.2.3.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A temperatura ótima foi determinada incubando a enzima em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 5,0 em diferentes temperaturas (35-80 °C) durante 10 minutos. A estabilidade a temperatura foi determinada incubando-se a enzima em tampão McIlvaine 0,1 M, pH 6,0 nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C. A atividade enzimática residual foi avaliada em intervalos de tempo de 0 a 120 minutos.

5.2.3.5 Efeito de íons e EDTA na atividade xilanásica

O efeito de alguns íons (NaCl, CaCl₂, K₂SO₄, MnCl₂ e FeCl₂) e quelante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram testados na concentração final de 1 e 5 mM, determinando-se a atividade xilanásica em condições ótimas de pH e temperatura.

5.2.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação da constante de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima de reação (Vmáx) da xilanase foi realizada com o substrato xilano de *beechwood* (Sigma-Aldrich) em concentrações entre 2-24 mg mL⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os valores dos parâmetros cinéticos Km e Vmáx foram calculados pelo gráfico de Lineweaver & Burk (1934) utilizando o programa Origin (6.0).

5.2.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I purificada de *P. crustosum*

A citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I produzida por *P. crustosum* foi investigada pelo método de MTT (brometo de (3-metil- [4-5-48 dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio) utilizando macrófagos de camundongo da linhagem C57Bl6, machos, de 2 meses de idade (Parecer do Comitê de Ética Animal anexo). Este método determina se houve modificação nas desidrogenases das células pelo MTT, observado apenas nas células metabolicamente ativas, pois estas são capazes de catalisar a redução do MTT em cristais de formazan (material colorido e insolúvel no meio de cultura). Os macrófagos foram obtidos do peritônio dos camundongos previamente eutanasiados com excesso de anestésicos. A cavidade peritoneal foi exposta abrindo-se a pele do animal sem romper a membrana do peritônio e foi realizada uma infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4 °C. O PBS injetado foi retirado com auxílio de uma seringa e agulha e a suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga Eppendorf 5810 R) a 410 x g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante resultante foi desprezado e o “pellet” ressuspensão em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 50 µg mL⁻¹ de gentamicina. Essa solução contendo células foi plaqueada na concentração de 2 x 10⁵ células/poço em placas para cultura de células. Após a incubação por 2 horas, a 37 °C em 5% de CO₂, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C. Uma vez plaqueados, os macrófagos foram incubados com o extrato bruto de *P. crustosum* ou xilanase-I purificada na concentração de 5 U mL⁻¹ de atividade enzimática em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período, determinou-se a viabilidade celular utilizando MTT e leitura a 550 nm no espectrofotômetro.

5.2.5 Efeito da xilanase-I na clarificação de sucos

Os sucos foram preparados lavando as frutas com H₂O destilada e cortando as mesmas em cubos aproveitando-se a polpa e nos sucos de goiaba e pêra também foram aproveitadas as cascas. Em seguida, as frutas foram trituradas em liquidificador doméstico com adição de 200 mL de H₂O destilada, o suco foi filtrado com auxílio de gaze estéril. 3 mL de cada suco foi distribuído em tubos de ensaio e a

xilanase-I purificada (na concentração de 5 U mL⁻¹) de *P. crustosum* foi adicionada nos sucos de manga, pêra e goiaba conforme a metodologia citada por Bajaj e Manhas (2012). A mistura contendo suco e xilanase-I foi incubada em banho-maria a 40 °C, após 60 minutos a reação foi interrompida por fervura a 100 °C por 1 minuto, e centrifugado a 3000 x g por 10 minutos. A turbidez dos sucos foi analisada através do espectrofotômetro em comprimento de onda de 600nm. O controle foi conduzido nas mesmas condições, exceto a enzima que foi substituída por H₂O deionizada.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Purificação da xilanase

A purificação da xilanase-I de *P. crustosum* foi conduzida em três passos cromatográficos. Ao realizar a purificação da enzima por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex, verificou-se a presença de dois picos de atividade enzimática, o primeiro pico (denominada xilanase-I) que não aderiu à resina e o segundo pico com afinidade a resina (denominada xilanase-II) (Figura 1 A). O relato de mais de uma xilanase produzida por fungos do gênero *Penicillium* foi descrito também por Chávez e colaboradores (2006). Nesse estudo, as frações com atividade da xilanase-I oriunda da DEAE-Sephadex foram aplicadas em uma coluna CM-Sephadex e a enzima foi eluída com gradiente de NaCl nas concentrações de 100 mM a 275 mM (Figura 1 B). Então, a última etapa de purificação da enzima foi na coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 (Figura 2) com recuperação de 0,06% e purificação de 22,18 vezes (Tabela 1). Similarmente, Liao e colaboradores (2014) utilizaram também três etapas de purificação com a xilanase de *Penicillium oxalicum* GZ-2, porém, a recuperação foi de 6,9% e de 6,4 vezes. Knob e colaboradores (2013) relataram recuperação de 76,92% e purificaram 5,10 vezes com a xilanase do fungo *Penicillium glabrum*.

A homogeneidade da xilanase-I purificada por métodos cromatográficos foi confirmada pela presença de uma única banda em eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE, com massa molecular de 23,44 kDa (Figura 3), portanto, essa enzima se enquadra junto a família GH 11 (que abriga xilanases com massa molecular menor que 30 kDa). A massa molecular da xilanase-I é próxima também

de xilanases encontradas para o gênero *Penicillium*. Tais como a xilanase de *P. oxalicum* relatada com massa molecular de 21,3 kDa (Liao *et al.*, 2014), bem como a xilanase de *P. occitanis* com peso molecular de 30 kDa (Driss *et al.*, 2012).

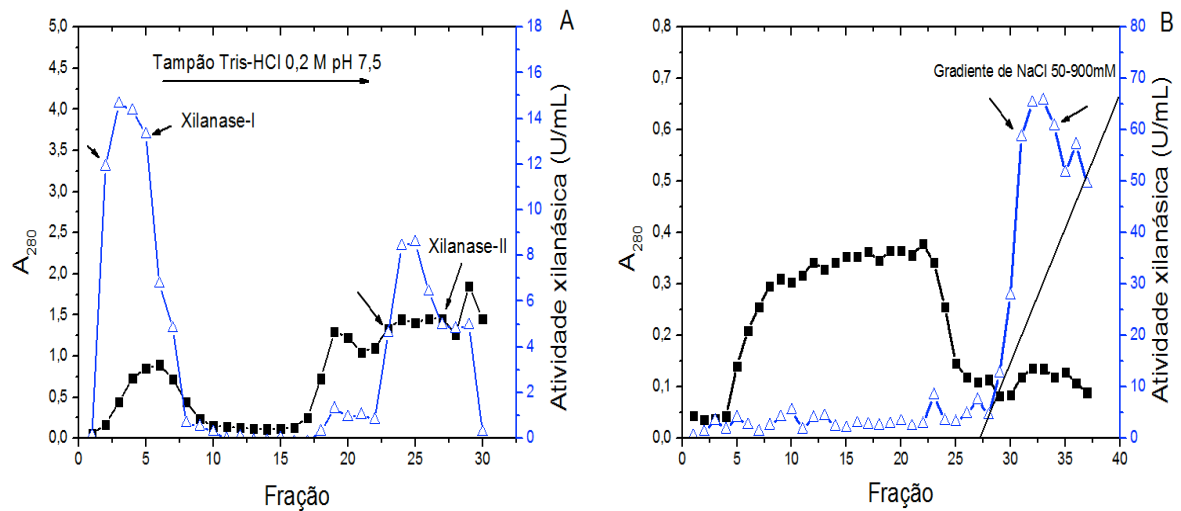


Figura 1 Perfil cromatográfico de purificação da xilanase de *P. crustosum* por DEAE-Sephadex (A) e CM-Sephadex (B). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5. Leitura das atividades xilanásicas a 540 nm (Δ) e absorbância à 280nm ($\blacksquare$). As frações reunidas estão indicadas pelas setas ($\rightarrow$).

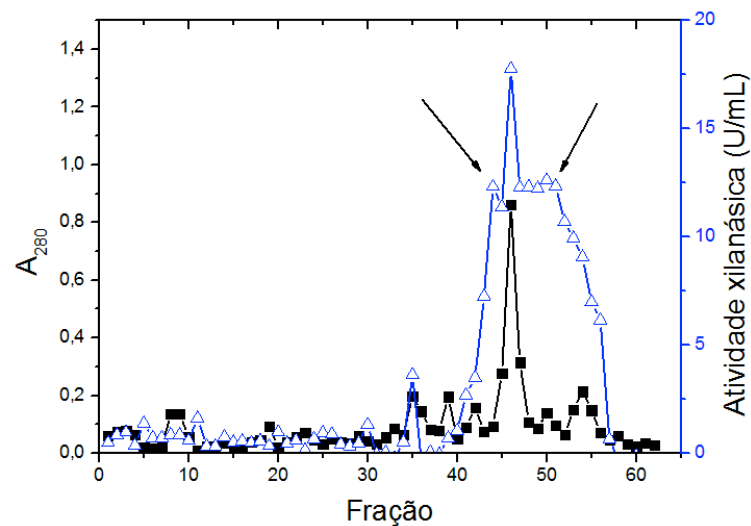


Figura 2 Perfil cromatográfico de purificação de xilanase de *P. crustosum* por Sephadex-G75. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,02M pH 5,5. Leitura das atividades xilanásicas a 540 nm (Δ) e absorbância à 280nm ($\blacksquare$). As frações reunidas estão indicadas pelas setas ($\rightarrow$).

Tabela 1 Etapas de purificação da xilanase-I produzida por *P. crustosum*

ETAPAS	Proteína Total (mg)	Atividade Enzimática (UTotais)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação %	vezes
Extrato Bruto	420	7.650	18,21	100	1
DEAE-Sephadex	19,02	1.104	58,04	4,52	3,18
CM-Sephadex	2,25	818	391,55	0,53	21,50
Sephadex-G75	0,255	103	403,92	0,06	22,18

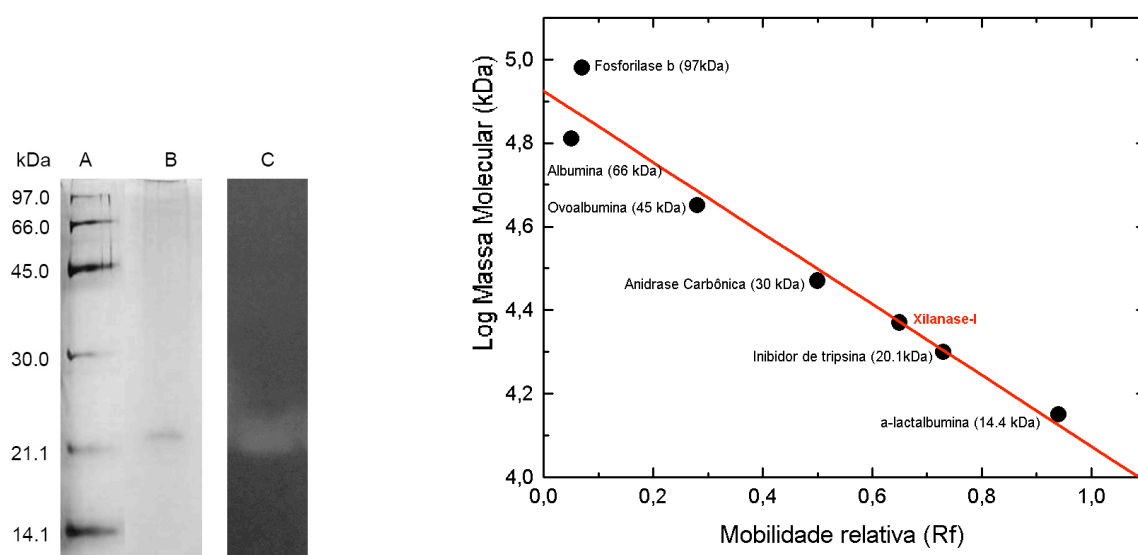


Figura 3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Marcadores de peso molecular (poço A): Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20,1kDa) e α-lactalbumina (14,4kDa) e xilanase-I (poço B). Zimograma da xilanase-I purificada (poço C).

5.3.2 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

A xilanase-I purificada de *P. crustosum* apresentou pH ótimo de 5,0 (Figura 4A). Este valor de pH ótimo assemelha-se a maioria das xilanasas do gênero *Penicillium* (Chávez *et al*, 2006), bem como o pH ótimo (5,0) encontrado para a xilanase de *P. citrinum* (Tanaka *et al*, 2005). No entanto, xilanasas com valores de pH ótimo inferiores a 5,0 também são reportados na literatura, tais como a xilanase-I do *P. sclerotiorum* com pH ótimo de 2,5 e 4,5 para a xilanase-II (Knob e Carmona, 2010) e xilanase de *P. occitans* com pH ótimo 3,0 (Driss *et al*, 2012).

A determinação da estabilidade ao pH das enzimas é importante para definir em qual processo industrial sua utilização será mais adequada. A xilanase-I de *P. crustosum* exibiu estabilidade na faixa de pH entre 4,0 a 7,0 (Figura 4B). O período de estabilidade enzimática ao pH da xilanase de *P. crustosum* foi superior aos encontrados na literatura, tais como da xilanase de *P. citrinum* com retenção de 80% de atividade residual após 3 horas, porém numa ampla faixa de pH (2,0-10,0) (Tanaka *et al*, 2005) e a xilanase de *P. oxalicum* foi estável em condições ácidas (3,0-5,0), com atividade residual de 95% por 30min (Liao *et al*, 2014). Enquanto que a xilanase parcialmente purificada de *P. expansum*, apresentou estabilidade de uma hora nos pH 5,5 e 6,5 (Querido, *et al*, 2005).

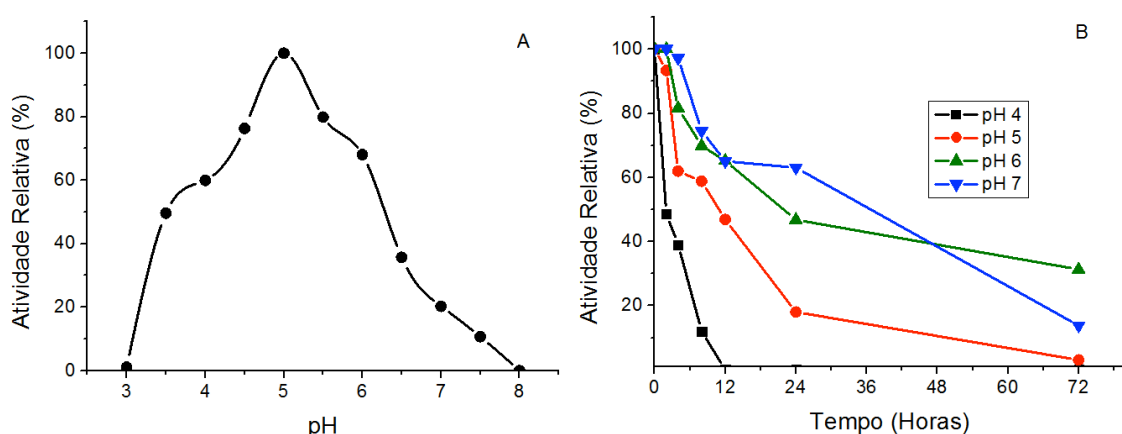


Figura 4 Efeito de pH na atividade (A) e estabilidade enzimática (B).

5.3.3 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática

A temperatura ótima encontrada para a xilanase-I purificada foi 50 °C (Figura 5A), semelhante à xilanase-I de *P. sclerotiorum* com atividade ótima à 50 °C, porém, a xilanase-II do mesmo fungo apresentou temperatura ótima de 55°C (Knob e Carmona, 2010). Entretanto, a xilanase parcialmente purificada de *P. expansum* apresentou temperatura ótima inferior (40 °C) (Querido *et al*, 2005), enquanto que a xilanase purificada de *P. glabrum* apresentou temperatura ótima superior (60 °C) (Knob *et al*, 2013).

A estabilidade térmica da xilanase-I do *P. crustosum* foi testada nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, e a enzima exibiu meia vida de 62 minutos a 50 °C,

porém nas temperaturas de 40 e 45 °C a enzima apresentou meia vida ($T_{1/2}$) de 120 minutos e 74 minutos, respectivamente (Figura 5B). Similarmente, a xilanase-I de *P. sclerotiorum* também apresentou termoestabilidade em temperaturas menores de 50 °C (Knob e Carmona, 2010). Por outro lado, a xilanase de *P. occitans* apresentou estabilidade térmica em alta temperatura (70 °C) por 30 minutos com atividade residual de 50% (Driss *et al*, 2012).

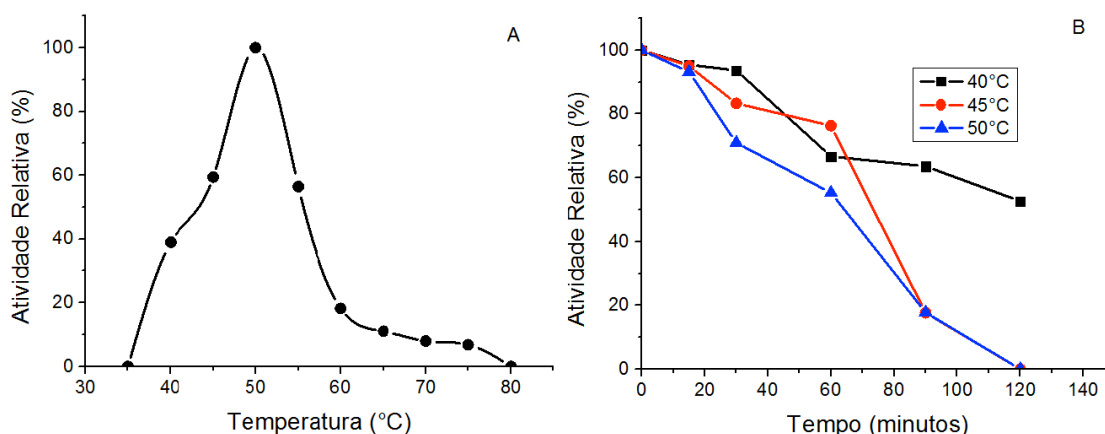


Figura 5 Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade enzimática (B).

5.3.4 Efeito de íons e EDTA na atividade xilanásica

Alguns compostos e íons metálicos podem influenciar diretamente na atividade catalítica de enzimas. Alguns íons como: Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e Fe^{2+} , são comumente encontrados em produtos alimentícios, por isso a necessidade de avaliar o efeito desses compostos visando aplicação no setor de indústria alimentícia. Nesse estudo, o Na^+ e Ca^{2+} na concentração de 5 mM inibiram a ação enzimática em 18% e 22%, respectivamente, enquanto que o K^+ proporcionou uma inibição ainda maior, de 29% e de 37% nas concentrações de 1 e 5 mM respectivamente. A xilanase de *Remersonia thermophila* também foi inibida por este íon, porém a inibição foi de apenas 7% na concentração de 1 mM (McPhillips *et al* 2014). O Fe^{2+} na concentração de 5 mM ativou significativamente a xilanase-I com aumento de 30%. Elgharbi e colaboradores (2015) relatam que o ferro proporcionou um aumento de 3,77% na atividade enzimática da xilanase purificada de *Aspergillus niger*. Enquanto que Sharma e colaboradores (2010) relatam diminuição de 60% na

atividade da xilanase-II purificadas do fungo *Malbranchea flava*. O íon Mn^{2+} apresentou aumento na atividade enzimática da xilanase-I do *P. crustosum* em 75,26% e 65,61% nas concentrações de 1 mM e 5 mM, respectivamente. Similarmente, foi observado um aumento de 25,65% na atividade da xilanase de *Remersonia thermophila* com o Mn^{2+} (McPhillips *et al* 2014). Por outro lado, o mesmo íon não afetou a atividade da xilanase I de *P. sclerotiorum*, enquanto que promoveu fortemente a atividade da xilanase II (Knob e Carmona, 2010). Além disso, o EDTA aumentou atividade da xilanase-I de *P. crustosum* em 19,82% e 47,36% nas concentrações 1 mM e 5 mM, respectivamente. A promoção da atividade enzimática pelo EDTA a 5 mM foi também observada nas duas xilanases purificadas de *Malbranchea flava* (Sharma *et al*, 2010) e na xilanase recombinante de *Aspergillus niger*, o qual a ativação enzimática foi de 20% (Hmida-Sayari *et al*, 2012). O EDTA é um agente quelante de íons adicionado em processos industriais, inclusive em alimentos enlatados (McPhillips *et al*, 2014). Segundo Hmida-Sayari e colaboradores (2012) a ativação enzimática proporcionada na presença do EDTA, pode ser em virtude da remoção de traços de íons metálicos que estariam inibindo a atividade enzimática. Esse argumento pode ser reforçado pelo efeito de inibição da atividade enzimática proporcionado pelo Mg^{2+} que diminuiu significativamente a atividade da xilanase-I, chegando a 74,70% na concentração de 5 mM. Efeito semelhante foi observado com a xilanase-I de *Malbranchea flava*, a qual, assim como o EDTA promoveu a atividade enzimática, o íon Mg^{2+} inibiu a sua atividade (Sharma *et al*, 2010). Ainda, Elgharbi e colaboradores (2015) relatam que nem EDTA nem Mg^{2+} afetam a xilanase purificada de *Aspergillus niger*, sugerindo que íons divalentes não afetaram a atividade catalítica desta enzima.

Tabela 2 Efeito de Íons sobre a atividade da xilanase-I de *P. crustosum*

Composto	1 mM	5 mM
Atividade Residual (%)		
Controle (Sem íon)	100±0,00	100±0,00
NaCl	106,83±0,01	82,1±0,00
CaCl ₂	114,99±0,01	78,67±0,01
KCl	71,63±0,01	63,38±0,01
MgCl ₂	75,46±0,02	74,70±0,01
MnCl ₂	175,26±0,02	165,61±0,02
FeCl ₃	104,9±0,03	129,99±0,03
EDTA	119,82±0,03	147,36±0,03

5.3.5 Parâmetros cinéticos

A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) encontrada para xilanase-I de *P. crustosum* foi $1.000 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ e o K_m de $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$. O baixo valor de K_m desta enzima demonstra alta afinidade pelo substrato xilano de *beechwood*. O valor de K_m da xilanase-I purificada de *P. crustosum* assemelha-se ao K_m encontrado para a xilanase *P. glabrum* para o mesmo substrato, que foi de $3,1 \text{ mg mL}^{-1}$, enquanto que o $V_{m\acute{a}x}$ dessa enzima foi apenas $194,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ (Knob *et al*, 2013). Porém, a xilanase de *P. oxalicum* apresentou um de K_m de $30,7 \text{ mg mL}^{-1}$ e de $V_{m\acute{a}x}$ de $403,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ (Liao *et al*, 2014). As xilanases fúngicas apresentam comumente valores amplos de K_m ($0,1$ a $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$) (Kocabas *et al*, 2015). Segundo Knob e colaboradores (2013) os valores de $V_{m\acute{a}x}$ para xilanases fúngicas variam de $0,106$ a $10.000 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

5.3.6 Avaliação de citotoxicidade do extrato bruto e da xilanase-I purificada de *P. crustosum*

A análise de efeitos citotóxicos tanto do extrato bruto quanto da xilanase-I purificada de *P. crustosum* foi realizada observando a viabilidade celular das células de macrófagos de camundongos, no intuito de aplicar essa enzima em diferentes setores alimentícios. As amostras (extrato bruto ou xilanase-I purificada de *P. crustosum*) não exibiram efeito citotóxico, ou seja, não causaram morte celular dos

macrófagos de camundongos na concentração testada (5 U mL^{-1}). Este teste é importante para a segurança de produtos aplicados tanto para alimentação humana como animal. Estudos semelhantes, porém utilizando diferentes culturas celulares foram realizados com extrato bruto de *Aspergillus japonicus* e de *Streptomyces viridosporus*, ambos para suplementação de ração animal e também não apresentaram citotoxicidade (Fachinni, F. D. A., 2009; Alberton, L. R. 2004).

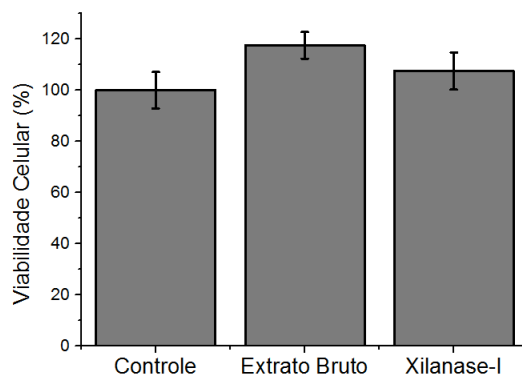


Figura 6 Viabilidade celular dos macrófagos na presença do extrato bruto e enzima xilanase-I purificada.

5.3.7 Aplicação da xilanase-I na clarificação de sucos

O efeito de turbidez dos sucos de goiaba, pêra e manga com adição de 5 U mL^{-1} xilanase-I de *P. crustosum* podem ser observados na figura 7, a turbidez observada nesses sucos foi na ordem de 91, 87, e 89% respectivamente (Tabela 3). Consequentemente, houve clarificação dos sucos tratados com xilanase-I purificada, sugere-se, portanto, que houve hidrólise do xilano presente na composição desses sucos. Uma vez que a trituração de frutas para produção de sucos libera componentes da parede celular vegetal como celulose, hemicelulose e pectina e estes ficam suspensos no suco, ocasionando turbidez natural. E o tratamento com enzimas que degradam os polímeros como a hemicelulose, pectina, e celulose, melhora na extração de outras substâncias contidas na fruta incluindo açúcares simples (Dhiman *et al*, 2011; Sharma e Kumar, 2013). Coquetéis enzimáticos utilizados pelas indústrias para clarificação de bebidas são compostos de enzimas como pectinases, celulase, amilase e hemicelulases (Yang *et al*, 2011). Relatos similares de clarificação dos sucos cítricos foram obtidos com xilanases de *Bacillus stearothermophilus* uma redução de 35,34% na turbidez do suco utilizando

12.5 IU/g de xilanase após otimização por métodos estatísticos (Dhiman *et al*, 2011). Enquanto que a xilanase de *Bacillus licheniformis* proporcionou uma diminuição de turbidez na ordem de 70,1, 76,4 e 78,8 para os sucos de abacaxi, mousambi (fruta cítrica típica da Índia) e suco de maçã, respectivamente (Bajaj e Manhas, 2012).

Tabela 3 Aplicação da xilanase-I e seu efeito na clarificação de sucos

Suco	Turbidez Relativa ^a (%)	
	Controle (suco sem xilanase)	Suco (tratado com xilanase-I)
Goiaba	100	91
Manga	100	87
Pêra	100	89

^a A turbidez (A_{600}) do controle para cada uma das concentrações é considerada 100%.

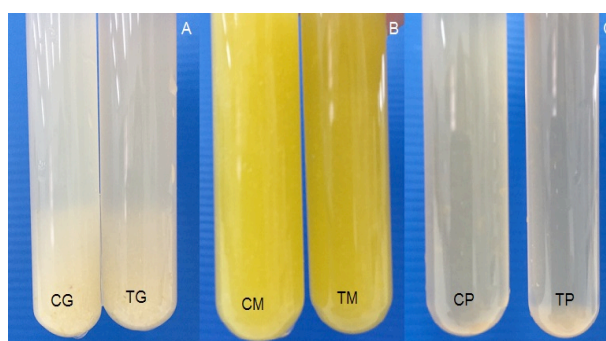


Figura 7 Efeito dos sucos tratados e não tratados com xilanase-I de *P. crustosum*. (A) Suco de goiaba controle (CG) e tratado com xilanase (TG). (B) Suco de manga controle (CM) e tratado com xilanase (TM). (C) Suco de pêra controle (CP) e tratado com xilanase (TP).

5.4 Conclusão

A xilanase-I purificada de *P. crustosum* apresentou características bioquímicas promissoras para aplicação biotecnológica, entre elas destaca-se o aumento de atividade enzimática na presença do EDTA, estabilidade enzimática em temperatura e pH favorável para processos de indústria alimentícia. Além disso, este é o primeiro relato sobre xilanase purificada de *P. crustosum* sem efeito citotóxico e com potencial para clarificação de sucos de goiaba, manga e pera.

5.5 Referências

- ALBERTON, L. R. *Produção de xilanase em resíduos agroindustriais por Streptomyces viridosporus T7A e aplicação do extrato bruto em veterinária*. 2004, 133 f., Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2004.
- BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 330-337, 2012.
- BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 56, p. 326-338. 2001.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROS, H.J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrilamides gels. *Electrophoresis*, v. 81, p. 93-9, 1988.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 413-433. 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 3-23, 2005.
- DHIMAN, S. S.; GARG, G.; SHARMA, J.; MAHAJAN, R.; METHOXY. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. *New Biotechnology*, v. 28, p. 746-755, 2011.
- DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresource Technology*, Bulgaria, v. 98, p. 2671-2678, 2007.
- DRISS, D.; BHIRI, F.; ELLEUCH, L.; BOULY, N.; STALS, I.; MILED, N.; BLIBECH, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of an extracellular acidophilic endo-1,4- α -xylanase, naturally deleted in the "thumb", from *Penicillium occitanis* Pol6. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1299–1306. 2012.
- ELGHARBI, F.; HMIDA-SAYARI, A.; ZAAFOURI, Y.; BEJAR, S. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion International. *Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 103-109, 2015.
- FACCHINI, F. D. A. *Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por Aspergillus japonicus com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes*. 2010 164 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2010.

HMIDA-SAYARI, A.; TAKTEK, S.; ELGHARBI, F.; BEJAR S. Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1839-1847, 2012.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and Characterization of Two Extracellular Xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A Novel Acidophilic Xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 429-443, 2010.

KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 115, p. 66-75, 2015.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-85, 1970.

LIAO, H.; SUN, S.; WANG, P.; BI, W.; TAN, S.; WEI, Z.; MEI, X.; LIU, D.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. A new acidophilic endo- β -1,4-xylanase from *Penicillium oxalicum*: cloning, purification, and insights into the influence of metal ions on xylanase activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p. 1071-1083, 2014.

LINEWEAVER, H. and BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal American Chemical Society*, 56, p. 658-666, 1934.

McPHILLIPS, K.; WATERS, D. M.; PARLET, C.; WALSH, D. J.; ARENDT, E. K.; MURRAY, P. G. Purification and Characterisation of a β -1,4-Xylanase from *Remersonia thermophila* CBS 540.69 and Its Application in Bread Making. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 172, p. 1747-1762, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, p. 424-426, 1959.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Brazil, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

QUERIDO, A. L. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial Purification and Characterization of Xylanase Produced by *Penicillium expansum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 3, p. 475-480, 2006.

REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. & WILLIAMS, D. E. Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels. *Nature*, v. 3, p. 195-281, 1962.

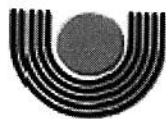
ROMANOWSKA I.; POLAK J.; BIELECKI S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. *Applied. Microbiology. Biotechnology*, v. 69, p. 665-671, 2006.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8834-8842, 2010.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: na overview. *Brtitish Biotechnology Journal*, v. 3, p. 1-28, 2013

TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and Properties of an Extracellular Endo-1,4- β -Xylanase from *Penicillium citrinum* and Characterization of the Encoding Gene. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, v. 100, n. 6, p. 623-630, 2005.

YANG, J.; LUO, H.; LI, J.; WANG, K.; CHENG, H.; BAI, Y.; YUAN, T.; FAN, Y.; YAO, B. Cloning, expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase from *Bispora* sp. MEY-1 and its potential application in juice clarification. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 272-277, 2011.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Avaliação dos efeitos de hidrolases obtidas de fungos filamentosos sobre macrófagos peritoneais de camundongos", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/11/2015

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE