

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA QUERIDO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA XILANASE
PRODUZIDA POR *Penicillium expansum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2002

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA QUERIDO

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DA XILANASE
PRODUZIDA POR *Penicillium expansum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA: 29 de novembro de 2002.

Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof^a. Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Dr^a. Virgínia Maria Chaves Alves
(Conselheira)

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho
(Orientador)

BIOGRAFIA

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA QUERIDO, filho de Adilson dos Santos Querido e Jurema de Sousa Querido, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, no dia 25 de outubro de 1971.

Em outubro de 1996, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em agosto de 2000, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, nível de Mestrado, da Universidade Federal de Viçosa.

INDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Microrganismo.....	19
3.2. Manutenção da cultura e produção do inóculo.....	19
3.3. Obtenção e padronização da suspensão de esporos.....	20
3.4. Composição dos meios de cultivo.....	20
3.5. Condições de cultivo e obtenção da enzima.....	20
3.6. Crescimento do fungo e produção da xilanase.....	21
3.7. Determinação da atividade da xilanase.....	21
3.8. Determinação de proteína total.....	21
3.9. Purificação da xilanase.....	22
3.10. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	23
3.11. Estabilidade térmica da enzima.....	23

3.12. Determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	24
3.13. Estabilidade em relação ao pH.....	24
3.14. Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	24
3.15. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	24
3.16. Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

QUERIDO, André Luiz de Souza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2002. **Purificação parcial e caracterização da xilanase produzida por *Penicillium expansum***. Orientador: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Virgínia Maria Chaves Alves.

O *Penicillium expansum* é um fungo filamentosso produtor de xilanase extracelular. Uma xilanase extracelular foi encontrada como a principal proteína na cultura filtrada de *P. expansum* quando cultivado em farelo de trigo 0,3 %. Em contraste com outros microrganismos, não foi encontrada multiplicidade de xilanase de *P. expansum* sob as condições usadas. Como estratégia de purificação parcial da enzima, foram realizados fracionamento com sulfato de amônia, cromatografia de exclusão molecular, ultrafiltração e cromatografia de troca iônica. O perfil de eluição das proteínas mostrou uma única forma de xilanase, sendo esta parcialmente caracterizada. O pH ótimo e a temperatura ótima foram 5,5 e 40 °C, respectivamente. A enzima se manteve estável quando pré-incubada por 1 h em pH entre 5,5 e 6,5. Também manteve a estabilidade quando pré-incubada por 1 h em temperatura entre 20-40 °C. A enzima apresentou Km de 3,03 mg mL⁻¹ e Vmax de 0,027 μmol min⁻¹ μg⁻¹ de proteína. A atividade enzimática foi aumentada 34 % por Mg₃(PO₄)₂ (1 mM); 31 % por MgSO₄ (1 mM) e 28 % por Al₂(SO₄)₃ (1 mM).

ABSTRACT

QUERIDO, André Luiz de Souza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, November 2002. **Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum***. Advisor: Jorge Luiz Cavalcante Coelho. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Virgínia Maria Chaves Alves.

Penicillium expansum is a filamentous fungus that produces extracellular xylanase. An extracellular xylanase was found to be the major protein in the filtrated culture of *P. expansum* when grown on 0,3 % wheat bran. In contrast to other microorganism no xylanase multiplicity was found in *P. expansum* under the conditions used. The used partial purification strategy was ammonium sulfate fractioning, molecular exclusion cromatography, ultrafiltration and anion exchange chromatography. The proteins elution profile showed only one form of xylanase that was partially characterized. The optimum pH and temperature were 5,5 and 40 °C, respectively. The enzyme kept stable when preincubed for 1 h under pH between 5.5 and 6.5. It also kept stable when preincubed for 1h under temperature between 20-40 °C. The enzyme showed km of 3,03 mg mL⁻¹ and Vmax of 0,027 µmol min⁻¹ µg⁻¹ of protein. The enzymatic activity was increased by 34 % by Mg₃(PO₄)₂ (1 mM); 31 % by MgSO₄ (1 mM).and 28 % by Al₂(SO₄)₃ (1 mM).

1. INTRODUÇÃO

A biomassa na forma de celulose é o maior constituinte das plantas, sendo a fonte orgânica mais abundante e renovável do planeta, com potencial para ser utilizada na produção de alimentos e energia.

Em termos de porcentagem de peso seco, as hemiceluloses são, após a celulose, os polissacarídeos mais importantes, constituindo cerca de 40 % da matéria lignocelulósica. O principal componente das hemiceluloses é a xilana, polímero constituído principalmente por xilose. A degradação completa da xilana a monômeros de xilose requer a ação sinérgica de um complexo de enzimas, entre as quais estão as endoxilanases e as xilosidases que desempenham o papel mais importante por degradarem a cadeia principal de xilana.

Para o processo de bioconversão de lignocelulose em produtos fermentativos, a degradação e utilização máxima de açúcares poliméricos são desejáveis. O complexo xilanolítico (e celulolítico) completo é requerido para alcançar a hidrólise total de substratos complexos e produzir resíduos monoméricos. Tal complexo pode ter xilanases, xilosidases e outras enzimas envolvidas na quebra das ramificações de xilana. A existência de preparações enzimáticas altamente ativas, de baixo custo e

que possam ser obtidas em grande quantidade é um importante critério para a implementação industrial.

O objetivo do presente trabalho foi purificar parcialmente a xilanase produzida por *Penicillium expansum*, caracterizando-a pela determinação da estabilidade térmica e do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; da estabilidade em relação ao pH e do efeito do pH sobre a atividade enzimática; do efeito de íons sobre a atividade enzimática e dos parâmetros cinéticos da enzima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é rígida o suficiente para dar à planta resistência e forma. A parede celular primária é constituída de cerca de 90 % de polissacarídeos e os 10 % restantes de proteínas. É uma estrutura altamente hidratada, com pouca quantidade de celulose, entre 25-40 % do peso seco (ROGERS e PERKINS, 1968). A parede secundária é mais densa, apresentando 40-60 % de celulose (peso seco) e menos hidratada que a parede primária (ROGERS e PERKINS, 1968).

Os polissacarídeos presentes na parede celular têm sido classificados em três grupos (TALMADGE et al., 1973):

- a) Polissacarídeos pécticos: extraídos por solução de oxalato de amônia, ácidos fracos ou agentes alquilantes. São polímeros compostos principalmente de resíduos galacturônicos.
- b) Celulose: homopolímero linear formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (WONG et al., 1988; BISARIA e GHOSE, 1981). A forma mais pura de celulose disponível na natureza contém cerca de 10 % do peso de polissacarídeos não-celulósicos, como proteínas e elementos minerais. A celulose

está sempre associada a outros polímeros, tais como hemiceluloses, pectina e lignina. Segundo TSAO (1986), duas razões dificultam a hidrólise de celulose: ser insolúvel em água, formando cristais e a sua coexistência com outros polissacarídeos, reduzindo a acessibilidade da enzima celulase à molécula celulose.

- c) Hemiceluloses: heteropolímeros não-celulósicos (WONG et al., 1988) que podem estar ligados covalentemente à pectina e associados não-covalentemente à celulose, podendo também ser definidos como polissacarídeos extraídos de tecidos lignificados de plantas pelo uso de álcali relativamente forte (WILKIE, 1979).

Além dos polissacarídeos, a parede celular vegetal é constituída de 25 % de lignina (LADISCH, 1979). Segundo TSAO (1986), a estrutura da lignina ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que se trata de uma macromolécula polifenólica complexa. Sua função é manter as fibras interligadas evitando, assim, a degradação enzimática da parede celular dos vegetais (LADISCH, 1979).

2.2. Hemicelulose e xilana

A distribuição de vários componentes lignocelulósicos através da parede celular depende da espécie, crescimento e diferenciação celular (WONG et al., 1988).

A maioria das hemiceluloses são moléculas relativamente pequenas, contendo entre 70 e 200 unidades de monossacarídeos (COUGHLAN, 1992). A composição das hemiceluloses pode ser influenciada por vários fatores como crescimento, maturação, natureza do solo, clima, localização geográfica e tipo de fertilizante usado. (WILKIE, 1979).

Os polímeros de hemicelulose podem conter os mais variados resíduos de açúcar na sua composição como D-xilose, D-glicose, D-galactose, L-arabinose, ácido D-glicurônico, ácido D-galacturônico, ácido 4-O-metil-D-glicurônico, grupos O-acetil e

ésteres ferulolato ou coumarato ligados à cadeia principal, via resíduos de L-arabinose (PULS e POUTANEN, 1989).

A parede celular das plantas contém xilanas, xiloglicanas e heteroxilanas (DEY e BRINSON, 1984). A Xilana, o principal componente das hemiceluloses, é um polímero de monômeros de xilose unidos por ligações β -1,4. Dependendo da origem da xilana, podem ocorrer diferentes substituições na cadeia principal, as quais incluem: acetilação do C-2 ou C-3, ácidos glicurônicos ou 4-O-metilglicurônico em ligações α -1,2 e arabinofuranosil em ligações α -1,3 (COUGHLAN, 1992).

O sistema de enzimas que degradam a xilana tem sido extensivamente estudado, embora seja menos conhecido quando comparado ao sistema de enzimas que degradam celulose. A razão é que enquanto a celulose é composta de somente D-glicose e apresenta a mesma estrutura em todas as plantas, a estrutura da xilana é mais complexa e varia de planta para planta. Apesar disto, o sistema de enzimas xilanolíticas deve receber a mesma atenção que o sistema celulolítico, devido ao seu potencial biotecnológico ser igualmente importante (BIELY et al., 1986).

2.3. Enzimas xilanolíticas

Em virtude das xilanas serem, por natureza, bastante heterogêneas, sua completa degradação a monômeros de xilose requer a ação sinérgica de uma bateria de enzimas, entre as quais a endoxilanase (1,4- β -D-xilanhidrolase; EC 3.2.1.8) que cliva as ligações glicosídicas internas e exoenzimas, β -xilosidase (β -D-xilosideo xilohidrolase; EC 3.2.1.37) que remove resíduos de açúcar nos finais das cadeias (COUGHLAN, 1992). A endoxilanase e a β -xilosidase desempenham o papel mais importante por degradarem a cadeia principal de xilana. Outras enzimas, mostradas na Figura 1, degradam as cadeias laterais do polímero (FERREIRA-FILHO, 1994).

As endoxilanases hidrolisam as ligações β -1,4 interna na cadeia xilopiranosídica, resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato. O sítio de ação no substrato depende do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e dos tipos de substituições nele presentes. Os principais produtos formados são diversos xilo-oligossacarídeos. As β -xilosidases, por sua vez, são exoglicosidases que hidrolisam pequenos xilo-oligossacarídeos e xilobiose, a partir da extremidade não-redutora dos mesmos, produzindo xilose. Endoxilanases são mais ativas contra xilo-oligossacarídeos de cadeia longa (FERREIRA-FILHO et al., 1993), enquanto as β -xilosidases têm sua atividade elevada com a diminuição do tamanho do substrato (WONG et al., 1988).

A elucidação do mecanismo de ação das hidrolases de polissacarídeos com substratos poliméricos naturais é complicada, devido a estes passarem por repetidas hidrólises pela enzima. A hidrólise completa da hemicelulose depende da presença de enzimas que quebram os vários pontos de ramificação deste polímero (BIELY et al., 1986).

A Figura 2 apresenta um esquema representativo para a hidrólise de xilanas pela ação de enzimas xilanolíticas de *Trichoderma reesei*. No mecanismo proposto para a degradação de xilana por enzimas hemicelulolíticas de *Trichoderma reesei*, observa-se que endoxilanases são responsáveis pelo decréscimo inicial do grau de polimerização do substrato, ocorrendo formação de oligossacarídeos solúveis de cadeia curta que são, então, degradados por enzimas que hidrolisam grupos laterais (PULS e POUTANEN, 1989). O sinergismo entre endoxilanases e enzimas que hidrolisam esses grupos, completa a hidrólise (FERREIRA-FILHO, 1994).

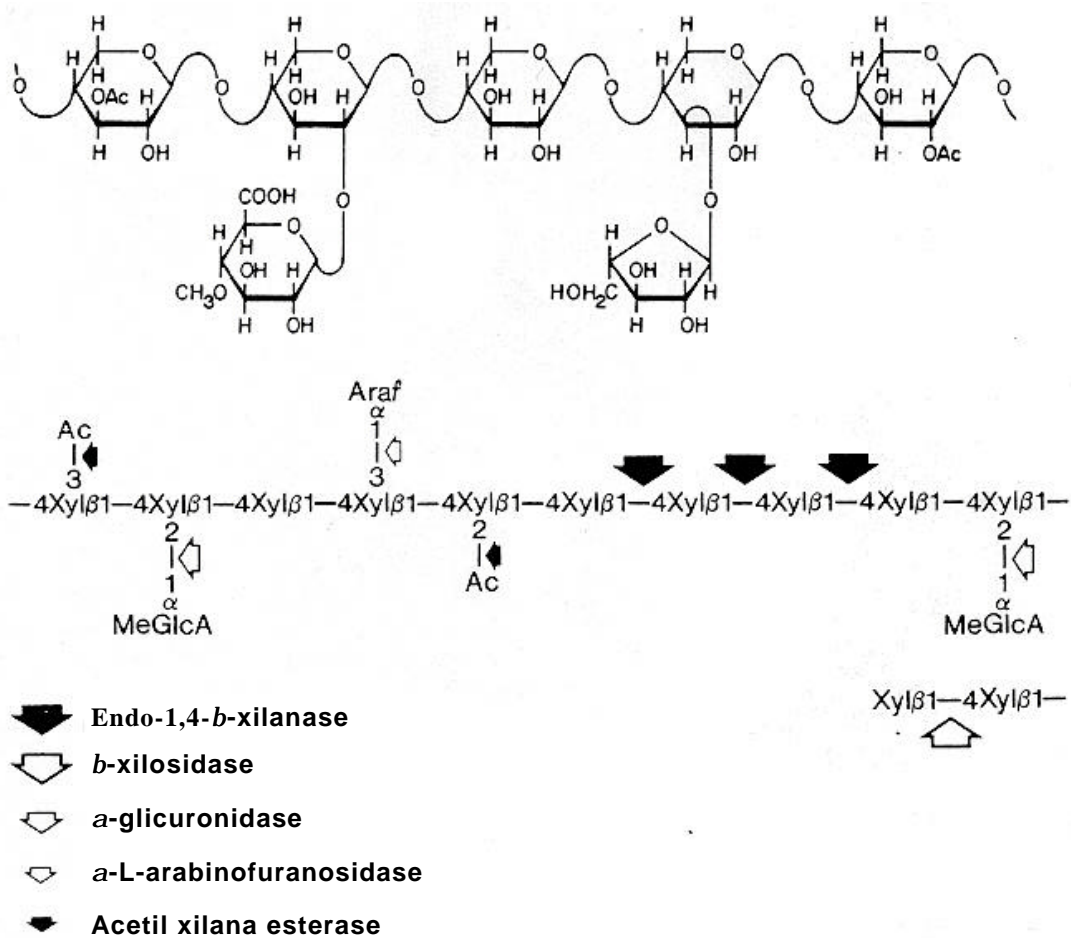


Figura 1. Cadeia polimérica da xilana e sítios de hidrólise das enzimas xilanolíticas microbianas. O fragmento apresentado na parte superior da Figura é compreendido de cinco unidades de D-xilose. Ac, grupo acetil; Araf, L-arabinofuranose; MeGlcA, ácido 4-0-metil-D-glicurônico; Xyl, D-xilose. Fonte: BIELY et al. (1986).

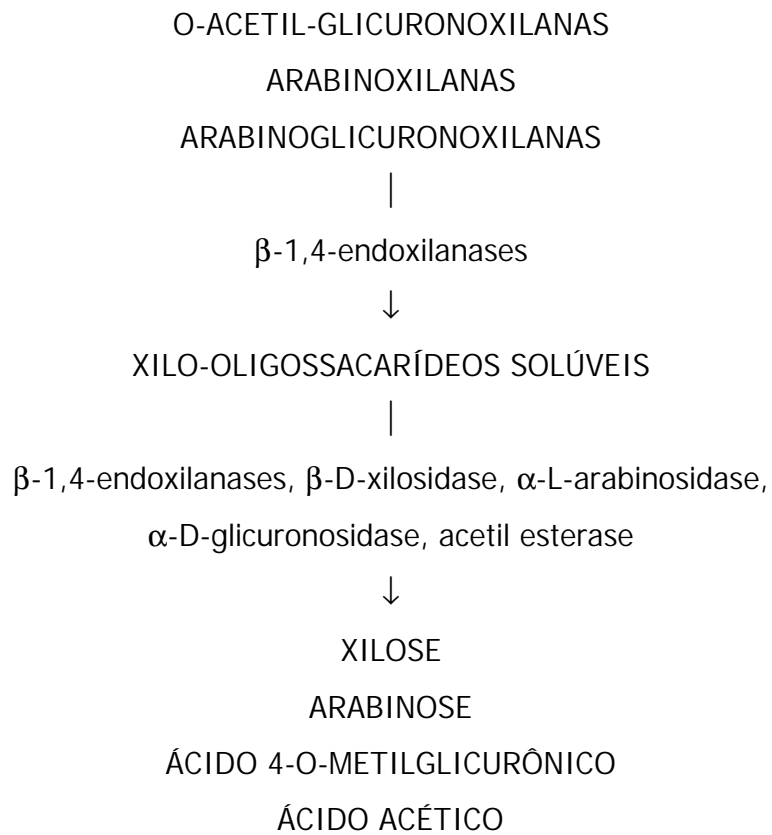


Figura 2. Hidrólise de xilanas pela ação de enzimas xilanolíticas de *Trichoderma reesei* (modificado de PULS e POUTANEN 1989).

2.4. Aplicação de enzimas microbianas em processos industriais

O uso de enzimas microbianas na hidrólise industrial de lignocelulose é vantajoso pela alta especificidade das reações enzimáticas, pelas condições amenas de reação, pela ausência de perda do substrato devido às modificações químicas e formação de subprodutos e pela alta eficiência de conversão (potencial catalítico). Além disto, não é corrosivo e ecologicamente correto, quando comparado à utilização de hidrólise ácida (WONG et al, 1988).

Segundo GODFREY e WEST (1996), a aplicação de enzimas microbianas em processos industriais é uma área que vem adquirindo crescente importância nos últimos anos. No período de 1983 a 1995, o mercado mundial, englobando todas as enzimas de aplicação industrial, aumentou de \$ 400 milhões para \$ 1 bilhão, com previsão de atingir entre \$ 1,7 e 2 bilhões no ano 2005. Esses autores relataram que 75 % das enzimas industriais são hidrolíticas no seu modo de ação, sendo os principais setores os de detergente (32 %), amido (15 %), laticínios (14 %) e têxtil (10 %). Os 29 % restantes do mercado mundial abrangem os seguintes setores: álcool, alimentação animal, panificação, biotransformação, diagnósticos, gorduras e óleos, aromatizantes, sucos e vinhos, couro, proteínas (outras que não sejam para coagulação, aromatizantes e detergentes), papel e celulose e tratamento de resíduos. Prevê-se que estes 29 % transformem-se em 47 % até o ano 2005. Os autores afirmam ainda que 90 % de todas as enzimas produzidas com propósitos industriais derivam de fermentações por microrganismos.

No processo de biopolpação nas indústrias de papel e celulose têm sido sugeridos tratamentos fúngicos devido à redução dos custos de energia no refinamento da polpa (PILON et al., 1992). As xilanases podem hidrolisar seletivamente certos componentes da xilana. A remoção total de xilana da fibra não é necessária, devido a sua significativa contribuição no que concerne a resistência da

fibra e qualidade do papel. Tais considerações também se aplicam ao processamento de outras fibras lignocelulósicas como linho, juta e rami (SHARMA, 1987).

As xilanases podem ser usadas na purificação de celulose, sendo este processo dependente da seletividade da enzima, da ausência de atividade celulolítica e da disponibilidade das preparações enzimáticas em larga escala. A atividade celulolítica de algumas enzimas pode ser inibida pela adição de mercúrio, mas esse procedimento requereria o tratamento de resíduos, tornando-o altamente oneroso (NOÉ et al., 1986). O complexo xilanolítico puro, sem a presença de celulases, torna a biopolpação e o processamento de fibras vegetais mais eficientes, pois a celulose é preservada.

A ação da xilanase no tratamento de polpas celulósicas auxilia a remoção da lignina que resta após o cozimento. No processo Kraft, a lignina é removida a altas temperatura e pH básico e a fração residual que permanece confere a cor amarelada à polpa, por ter sido extensivamente oxidada e modificada durante o processo. Para se obter um papel de alta qualidade, toda a lignina deve ser removida; isto é feito tradicionalmente com produtos baseados em cloro (branqueamento). Esse processo, embora altamente efetivo, produz compostos orgânicos clorinados, sendo poluente (SINGH, 1979; KHASIN et al., 1993).

VIKARI et al. (1991) demonstraram que hemicelulases podem ser usadas para estimular a deslignificação e o branqueamento da polpa não-branqueada. O maior efeito das enzimas é a hidrólise de xilana reprecipitada e reabsorvida e o complexo xilana-lignina é separado durante o cozimento. Com esses tratamentos, a quantidade de produtos químicos usados pode ser diminuída, principalmente o cloro. Como consequência do uso de hemicelulases em tal processo, tem-se melhor qualidade do papel e redução de problemas ambientais (WONG et al., 1988).

A aplicação de xilanase livre de celulase de *Aspergillus niger* An-76 foi usada no tratamento da polpa de farelo de trigo antes do branqueamento a 50 °C durante 3 ou 4 h, com diferentes dosagens da enzima. O resultado mostrou que quanto maior a

dose de xilanase empregada no processo, maior a quantidade de xilose liberada da polpa, o que implica que mais hemicelulose foi hidrolisada (YINBO et al., 1996).

O processo de maceração de fibras celulósicas com o propósito de produzir fios para a indústria têxtil (desengomagem) pode ser realizado por métodos químicos (soda cáustica) ou biológicos, envolvendo enzimas como pectinases e xilanases (BIELY, 1985).

A bioconversão de hemicelulose em etanol tem um custo menor do que a bioconversão de celulose em etanol, tornando o processo economicamente viável (INGRAM et al., 1992, DEKKER, 1993). O processo envolve quatro etapas: pré-tratamento, produção enzimática, clarificação (DEKKER, 1993) e fermentação de etanol, com ou sem formação intermediária de xilulose. Outro exemplo de biotransformação é a produção de xilitol a partir de hemicelulose.

O uso associado de xilanases, celulasas e pectinases se aplica à remoção de sólidos em suspensão no processamento de sucos de frutas e liquefação de vegetais (BIELY, 1985; VAN DER BROECK et al., 1990; TENKANEN et al., 1992) no preparo de dextranas para uso como espessante de alimentos, nas indústrias vinícolas (TAN et al., 1987; WONG et al., 1988), de detergentes (THOMSEN, 1989), sucos de frutas (GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1993), no tratamento de resíduos e efluentes (DE RONZO, 1977) entre outros.

De acordo com VAN DER BROECK et al., (1990), xilanases melhoram algumas características do pão como firmeza da casca e do miolo e textura. MUTSAERS (1991) sugere que a arabinoxilana, principal polissacarídeo do endosperma da parede celular do trigo, retém cerca de 1/3 da água adicionada à massa, o que dificulta a homogeneidade dos ingredientes piorando as características do pão. A xilanase atua na hidrólise de arabinoxilana para que a água retida seja incorporada à massa. Na Europa, o uso de brometo de potássio na massa do pão e dióxido de enxofre na massa de biscoito tem sido vetado por reduzir a elasticidade do glúten. Em

substituição a esses compostos estão as hemicelulases, incluindo as xilanases (GODFREY e WEST, 1996).

Na indústria vinícola, a aplicação de enzimas xilanolíticas permite a degradação de frutas ou seleção extrativa de alguns de seus componentes, levando à criação de novos produtos e derivados da fruta. Tais enzimas auxiliam na clarificação e filtração, objetivando a alta qualidade dos vinhos (GODFREY e WEST, 1996). As xilanases associadas às pectinases auxiliam na extração do suco devido à diminuição da viscosidade, facilitando a prensagem da uva, que é aumentada em 15 % e a maceração, que chega a 50 % além do normal. Também atuam na extração e liberação de compostos como açúcares fermentáveis, taninos, proteínas, polissacarídeos, ácidos orgânicos ou sais minerais (GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1993).

No processo da fabricação de cerveja, a xilanase atua rompendo sólidos em suspensão, melhorando principalmente a etapa da filtração (VAN DER BROECK et al., 1990).

Outras aplicações das xilanases incluem hidrólise de xilana a carboidratos fermentáveis por bioconversão e remoção de hemicelulose (GILBERT et al., 1992); hidrólise parcial de xilana em rações animais, aumentando a digestibilidade; obtenção de xilobiose, xilotriose e outros xilo-oligossacarídeos para serem usados como padrão para cromatografia (WONG et al., 1988).

2.5. Utilização das xilanases em escala industrial

Um dos grandes problemas da utilização das xilanases em escala industrial é o elevado custo da produção dessas enzimas. As xilanases são sintetizadas e secretadas por fungos ou bactérias no meio de cultivo em resposta à presença de indutores de alto custo. O ideal é que esses indutores sejam substituídos por substratos precursores de menor custo (MISHRA et al., 1990). Além da presença do

substrato indutor, a produção de enzimas extracelulares é influenciada por condições ambientais como temperatura, pH, aeração e idade do inóculo (PALMA, 1993).

De acordo com MISHRA et al. (1990), a obtenção de enzimas xilanolíticas em larga escala e com baixos custos deve se basear em substratos lignocelulósicos. Alguns destes materiais alternativos têm sido testados como, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar que é bastante atrativo. Acredita-se que, por ser um substrato heterogêneo, pode ser fonte de indução de xilanase (PALMA, 1993).

Substratos alternativos foram avaliados por KADOWAKI et al. (1997), com *Aspergillus tamarii*. Foram obtidos os seguintes valores de atividade xilanolítica: grão de milho, 76,61 U/mL; farelo de trigo, 54,32 U/mL; e bagaço de cana-de-açúcar, 16,68 U/mL. GASPAR et al. (1997) cultivando *Penicillium canescens* em diferentes substratos, obtiveram os seguintes resultados de atividade xilanolítica: farinha de soja (270 U/mL), palha de trigo (230 U/mL) e palha de milho (70 U/mL). Esses autores encontraram atividade xilanolítica em xilana "oat spelt" superior a xilana "birchwood".

2.6. Regulação metabólica das xilanases

As enzimas xilanolíticas de bactérias não-celulolíticas e leveduras são, na maioria das vezes induzidas, sendo a xilana o melhor indutor (FERNANDEZ-ESPINAR et al., 1994). No que se refere à repressão, a síntese é inibida por açúcares prontamente assimiláveis como glicose, lactose e xilose (GASPAR et al., 1997). Por outro lado, a regulação da síntese de β -xilanase em fungos filamentosos não foi estabelecida devido à diversidade de mecanismos de controle celular (BIELY, 1985).

Durante o crescimento em xilana, várias espécies produzem xilanases específicas com poucas ou nenhuma celulase. Entretanto, quando crescidas em celulose, celulases são produzidas juntamente com xilanases (incluindo xilanases específicas). A estratégia para obter o complexo xilanolítico livre de celulases pode,

simplesmente, ser crescimento dos microrganismos em xilana não contaminada com celulose (BIELY et al., 1986).

2.7. Multiplicidade das xilanases

Diversos autores constataram que pode haver a produção de mais de uma xilanase, com características variáveis, por um mesmo microrganismo. A multiplicidade de xilanases em microrganismos pode ser estratégia para alcançar uma hidrólise superior de xilana (WONG et al., 1988).

A presença de múltiplas xilanases pode estar relacionada com a hidrólise de outros polissacarídeos contendo xilose ou de substratos secundários. Além disso, considerando que a xilana é um fator importante na coesão da fibra, a função primária de múltiplas xilanases pode estar relacionada com a destruição da integridade da fibra expondo outros componentes lignocelulósicos a outras hidrolases. A quebra da ramificação e/ou atividade transferase em algumas xilanases ao invés da hidrólise de ligações xilosídicas, são relatadas na literatura. É possível também que a significância de múltiplas xilanases esteja na habilidade de funcionar sobre diferentes condições físico-químicas, já que suas propriedades podem diferir substancialmente (WONG et al., 1988).

WONG et al.(1988) sugerem que as xilanases podem ser aloenzimas, que são produtos de diferentes alelos do mesmo gene.

A ocorrência de múltiplas xilanases pode ser devido ao processamento diferencial de mRNA, proteólise parcial ou diferenças no grau de amidação e glicosilação (BIELY et al., 1986). Muitas xilanases são aparentemente glicosiladas (GORBACHEVA e RODIONOVA, 1977).

Se múltiplas xilanases são produtos de genes distintos, é possível que elas tenham função relativamente similar ou tenham sido derivadas de genes relacionados (GIBSON e McCLEARY, 1987).

O Quadro 1, apresenta uma relação de fungos produtores de xilanases, encontrados na literatura.

Quadro 1. Fungos produtores de xilanases

Fungo	Referência
<i>Aspergillus fischeri</i>	CHANDRA, et al., 1996
<i>Aspergillus flavipes</i>	SHERIEF, 1990
<i>Aspergillus nidulans</i>	FERNÁNDEZ-ESPINAR et al., 1994
<i>Aspergillus niger</i>	GORBACHEVA e RODIONOVA, 1977
<i>Aspergillus ochraceus</i>	BISWAS et al., 1990
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAILEY et al., 1991
<i>Aspergillus sojae</i>	KIMURA e TAJIMA, 1998
<i>Aspergillus tamarii</i>	KADOWAKI et al., 1997
<i>Aspergillus sydowii</i>	GHOSH, 1994
<i>Aspergillus terreus</i>	GHAREIB, 1992
<i>Aureobasidium pullulans</i>	CHIRTOV e PRIOR, 1994
<i>Paecilomyces varioti</i>	KELLY et al., 1989
<i>Penicillium canescens</i>	CURTO et al., 1998
<i>Penicillium expansum</i>	PINHEIRO, 1999
<i>Penicillium funiculosum</i>	FADEL e FOUDA, 1993
<i>Penicillium griseoroseum</i>	FERREIRA, 1999
<i>Penicillium hrysogenum</i>	HASS et al., 1992
<i>Penicillium janthinellum</i>	CUROTTO et al., 1994
<i>Penicillium purpurogenum</i>	BELANCIC et al., 1995

2.8. Purificação de proteínas

Para estudar uma proteína em qualquer dos seus muitos detalhes é preciso inicialmente, separá-la de todas as outras proteínas celulares; para isto precisamos dispor de técnicas para determinar suas propriedades. Os métodos necessários para tanto provêm da química de proteínas. A preparação pura de uma proteína é fundamental para determinação de suas propriedades, sua composição de aminoácidos e seqüência dos mesmos. Os métodos para separar as proteínas aproveitam-se das propriedades exibidas pelas mesmas como a carga elétrica, o tamanho e a solubilidade, os quais variam de uma proteína para outra. Como muitas proteínas ligam-se a outras biomoléculas, elas também podem ser separadas em função destas propriedades de ligação (LEHNINGER, 1995).

O Quadro 2 mostra diferentes estratégias de purificação parcial das xilanases produzidas por fungos.

Quadro 2. Purificação parcial das xilanases

Fungo	Pré-coluna	Cromatografia	Referência
<i>Aspergillus fisheri</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 60 % Diálise	DEAE-Sephadex A-50 DEAE-Celulose PPB pH 8,0	CHANDRA et al., 1996
<i>Aspergillus flavipes</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ Diálise	Sephadex G-25 BioGel P-100	SHERIEF, 1990
<i>Aspergillus terreus</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ Diálise	Sephadex G-50 DEAE-Celulose	GHAREIB, 1992
<i>Penicillium purpurogenum</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ Diálise	BioGel P-100 DEAE-Celulose CM-Sephadex	BELANCIC et al., 1995
<i>Aspergillus niger</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ 80 % Diálise	Sephadex G-100 DEAE-BioGel-A CM-BioGel-A PPB pH 6,8	YIMBO et al., 1996

Aspergillus fischeri Fxn1, um fungo alcali-tolerante, foi isolado por CHANDRA et al. (1996) para produção de xilanases. Objetivando a purificação da(s) enzima(s), foi realizado fracionamento com sulfato de amônio, seguido por cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose e cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex. O perfil de eluição das proteínas na coluna de troca iônica mostrou um pico de xilanase. A massa molecular aproximada foi 31 kDa, condizente com a de outras xilanases de *Aspergillus* sp. também reportadas, com massa molecular entre 13 e 50 kDa. YIMBO et al. (1996) estudaram enzimas xilanolíticas de *Aspergillus niger*, caracterizando três endoxilanases e uma β -xilosidase. As xilanases apresentaram os parâmetros expostos no Quadro 3.

Quadro 3. Xilanases de *Aspergillus niger*

	xilanase I	xilanase II	xilanase III
Massa molecular (kDa)	23	22	41
Ponto isoelétrico	4,1	3,9	4,9
Carboidratos (%)	12,5	9,4	7,8
Temperatura ótima (°C)	45-55	45-55	45-55
pH ótimo	3,5-4,0	5,0	3,0

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Penicillium expansum*, isolado no Departamento de Fitopatologia da UFV, a partir de sementes florestais.

3.2. Manutenção da cultura e produção do inóculo

O microrganismo foi cultivado em meio ágar-aveia, constituído de 40 g/L de farinha de aveia e de 15 g/L de ágar-ágar e estocado em geladeira a 5-10 °C. Para a produção do inóculo, as culturas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio e incubadas a 25 °C por 5 dias.

3.3. Obtenção e padronização da suspensão de esporos

A suspensão de esporos foi obtida a partir das culturas crescidas por 5 dias. Esta suspensão foi feita por meio da raspagem da superfície da cultura com alça de platina e ressuspensão em solução estéril de *tween* 0,5 % (p/v). A suspensão de esporos foi homogeneizada em vortex e o inóculo foi padronizado em 10^6 esporos mL^{-1} de meio de cultura, utilizando contagem em câmara de Neubauer. Os frascos contendo meio de cultura e o inóculo foram incubados em agitador rotacional a 150 rpm, 25 °C por 120 h.

3.4. Composição do meio de cultura

O cultivo de *P. expansum* foi realizado em meio mineral não tamponado, com a seguinte composição em g/L de água destilada: K_2HPO_4 , 0,62; KH_2PO_4 , 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,1; pH 6,3, acrescido de extrato de levedura, na concentração de 0,06 % (p/v), exceto quando mencionado. A única fonte de carbono foi farelo de trigo 0,3 %. O meio mineral, o MgSO_4 , o extrato de levedura e a fonte de carbono foram esterilizados separadamente a 121 °C, durante 30 minutos.

3.5. Condições de cultivo

O *P. expansum* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 500 mL de meio mineral, acrescido de 0,3 % de farelo de trigo, pH 6,3. Os frascos foram incubados em agitador rotacional a 150 rpm, 25 °C, por 120 h.

3.6. Crescimento do fungo e produção de xilanase

A massa micelial produzida foi separada do meio de cultura por filtração, em peneira de 400 malhas por polegada quadrada (poro de 37 μm). O filtrado da cultura foi o extrato bruto da enzima.

3.7. Determinação da atividade xilanolítica

A dosagem enzimática foi realizada de acordo com HALTRICH et al. (1993), usando como substrato xilana "oat spelt" 1 % (p/v) diluída em tampão fosfato 50 mM, pH 5.0. A mistura de reação, constituída de 1,5 mL de substrato e 0,5 mL da amostra enzimática, foi incubada por 20 minutos a 40 $^{\circ}\text{C}$, exceto quando mencionado de outra forma. Uma alíquota de 250 μL dessa mistura foi adicionada aos tubos de ensaio, contendo previamente 1,0 mL do reativo de DNS (MILLER, 1959) e 750 μL de água destilada. O conteúdo dos tubos foi aquecido em banho de água fervente por 5 minutos. A solução foi diluída com 8,0 mL de água destilada e agitada em vortex. Pela medida da concentração do produto, a atividade xilonolítica foi determinada e xilose utilizada na construção da curva padrão. Uma unidade de atividade xilanolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de xilose por minuto de reação.

3.8. Determinação de proteína total

A determinação da proteína total extracelular foi realizada pelo método de BRADFORD (1976), usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.9. Purificação da xilanase

O processo de purificação foi realizado de acordo com as etapas descritas abaixo. Em todas as etapas foram determinadas a atividade xilanolítica e a quantidade de proteína total.

Etapa 1. Após o crescimento, o sobrenadante da cultura foi separado do micélio por filtração em peneira de 400 malhas/polegada quadrada (37 μm de poro). O micélio foi descartado e o filtrado utilizado nas etapas que se seguiram.

Etapa 2. Um volume aproximado de 4 L do filtrado da cultura de *P. expansum* foi concentrado por liofilização. O liofilizado foi ressuspenso em 300 mL de tampão fosfato de potássio (PPB) 0,05 M, pH 7,2.

Etapa 3. Sulfato de amônia sólido foi adicionado ao material obtido na etapa 2 até o nível de saturação da ordem de 60 %. A adição foi realizada lentamente, em gelo e sob agitação, até completa dissolução do sulfato de amônia. Após a dissolução, a suspensão foi deixada sob agitação a 10 $^{\circ}\text{C}$ por mais 3 h e centrifugada por 15min/8000 *g*.

Etapa 4. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 20 mL de PPB, pH 7,2, 0,05 M e dialisado por 96 h contra o mesmo tampão, numa proporção de 6000 mL/20 mL, com trocas a cada 24 h. Como não foi encontrada atividade xilanolítica no sobrenadante da centrifugação, o mesmo foi descartado.

Etapa 5. O volume de 20 mL do dialisado foi aplicado em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25 (2,0 X 100 cm) pré-equilibrada em PPB, 0,05 M, pH 7,2. O processo cromatográfico foi desenvolvido sob um fluxo de 0,3 mL/min., sendo

coletadas frações de 3 mL para leitura de absorvância a 280 nm e determinação da atividade xilanolítica.

Etapa 6. As frações contendo atividade da enzima foram reunidas e submetidas a ultrafiltração (Millipore, Bedford, exclusão molecular 10 kDa), com redução do volume da amostra para 5 mL.

Etapa 7. O volume de 5 mL foi então aplicado em coluna da troca iônica DEAE-Sephadex A-50 (2,0 X 15 cm), pré-equilibrada em PPB, 0,05 M, pH 7,2. Foram aplicados 200 mL de um gradiente linear (0-0,5 M) de NaCl. O processo cromatográfico foi realizado sob um fluxo de 0,3 mL/min., sendo coletadas frações de 3 mL para leitura da absorvância a 280 nm e determinação de atividade xilanolítica.

3.10. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A determinação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi realizada em temperaturas no tubo de reação variando entre 20 °C e 70 °C, com intervalo de 10 °C.

3.11. Estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica foi determinada incubando a enzima por 1 h em temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C e posterior dosagem enzimática, como descrito no item 3.7.

3.12. Determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática

O efeito do pH na atividade xilanolítica foi avaliado realizando a dosagem enzimática como descrito no item 3.7, com o pH no tubo de reação variando na faixa de 4,0 a 9,0, com intervalo de 0,5 unidade. O pH foi ajustado com NaOH 2 M ou HCl 2 M.

3.13. Estabilidade em relação ao pH

A estabilidade da xilanase, foi avaliada incubando a enzima por 1 h em pH variando na faixa de 4,0 a 9,0, com intervalo de 0,5 unidade de pH, em gelo, tampão Tris /acetato de potássio/fosfato de potássio 50 mM. O pH foi ajustado com NaOH 2 M ou HCl 2 M. Após à incubação, foi realizada a dosagem enzimática como descrito no item 3.7.

3.14. Efeito de íons sobre a atividade enzimática

O efeito dos íons Mg^{+2} e Al^{+3} presentes nos compostos $Mg_3(PO_4)_2$ (concentração final de 1 mM), $MgSO_4$ (1 mM) e $Al_2(SO_4)_3$ (1 mM) sobre a atividade da xilanase foi avaliado através da adição de íons ao substrato xilana, em pH e temperatura ótimos de reação.

3.15. Determinação dos parâmetros cinéticos

As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas com base nas velocidades de reação em presença de 1,0; 1,3; 6,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 mg/mL do substrato xilana "oat spelt", em PPB 0,05 M, pH e temperatura ótimos. Gráficos duplos recíprocos foram usados para determinação dos valores de K_m e velocidade

máxima.

3.16. Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida foi realizada em gel a 12 % (LAEMELLI, 1970) e corado com nitrato de prata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a xilanase produzida por *P. expansum* foi parcialmente purificada e caracterizada. A metodologia utilizada para a purificação seguiu protocolos desenvolvidos para as xilanases de outros microrganismos como *Aspergillus fischeri* Fxn1 (CHANDRA et al., 1996) e *Aspergillus niger* (YIMBO et al., 1996).

A xilanase de *P. expansum* foi parcialmente purificada a partir do sobrenadante da cultura, por fracionamento com sulfato de amônia, seguido de cromatografia de exclusão molecular coluna Sephadex G-25, ultrafiltração (Millipore, Bedford, exclusão molecular 10 kDa) e cromatografia de troca iônica coluna DEAE-Sephadex A-50. A coluna de exclusão molecular teve como objetivo dessalinizar a amostra, sendo para isto escolhida a resina Sephadex G-25. As xilanases produzidas por diferentes fungos possuem massa molecular entre 13 e 50 kDa (CHANDRA et al., 1996).

No perfil de eluição das proteínas em cromatografia de exclusão molecular coluna Sephadex G-25, foi observado um pico de atividade da xilanase (Figura 3).

As frações contendo atividade foram reunidas (21 frações-63mL) e ultrafiltradas em membrana de exclusão molecular de 10 kDa. Após a ultrafiltração, a

amostra dessalinizada foi submetida à coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 (resina de grupo trocador dietil-aminoetil de $pK_a=8,5$). A maioria das xilanases de fungos filamentosos possui carga negativa em pH neutro (YIMBO et al., 1996).

A Figura 4 mostra o perfil de eluição das proteínas em cromatografia de troca iônica coluna DEAE-Sephadex A-50.

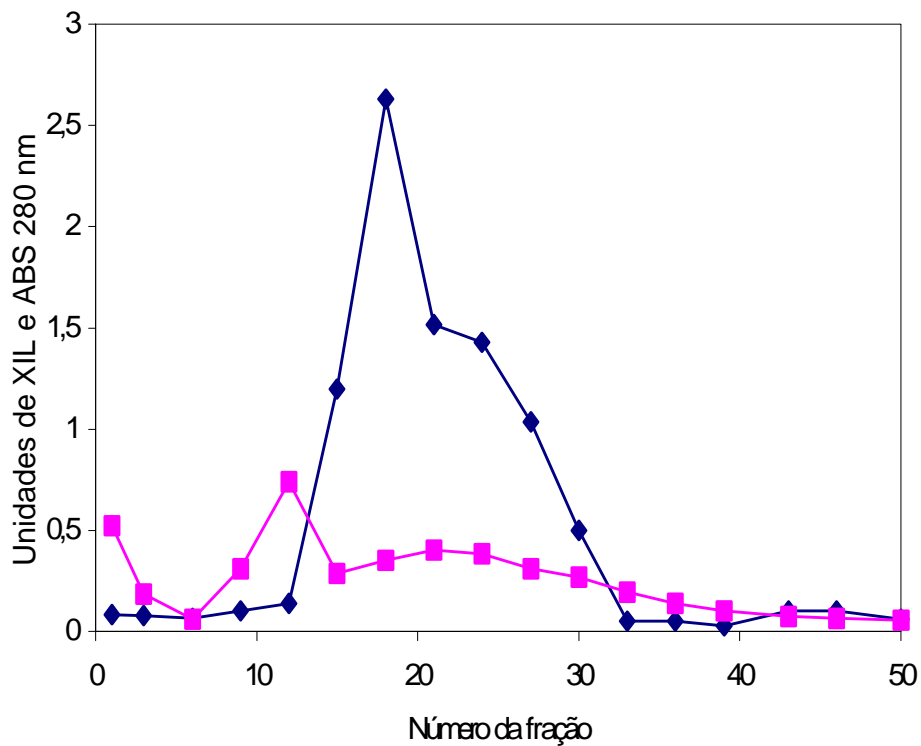


Figura 3. Perfil de eluição das proteínas em cromatografia de exclusão molecular coluna Sephadex G-25. (◆) Unidades de xilanase. (■) Absorvância em 280 nm.

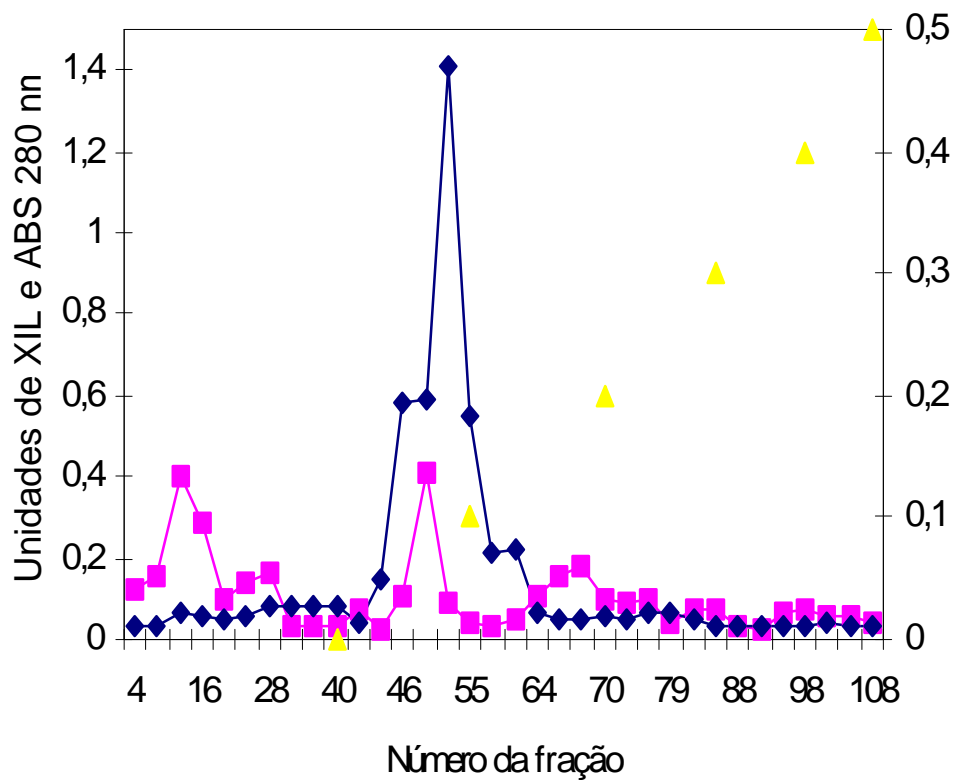


Figura 4. Perfil de eluição das proteínas em cromatografia de troca iônica coluna DEAE-Sephadex A-50. (◆) Unidades de xilanase. (■) Absorvância em 280 nm. (▲) Gradiente de NaCl (0-0,5 M).

Foi eluído um pico de atividade durante o gradiente linear de NaCl com força iônica de 0,1 M. O perfil de eluição das proteínas em cromatografia de troca iônica, sugeriu a existência de uma única forma de xilanase, sendo esta, secretada no sobrenadante da cultura de *P. expansum*.

As frações contendo atividade da enzima foram reunidas (20 frações-60mL) e caracterizadas.

O Quadro 4 mostra um resumo das etapas de purificação parcial da xilanase de *P. expansum*.

Quadro 4. Resumo das etapas de purificação parcial da xilanase de *P. expansum*.

Etapa da purificação	Proteína (mg)	Atividade (U _t)	Atividade específica	Recuperação (%)	Purificação
Sobrenadante da cultura	190	4287	22,56	100	1
Fracionamento (NH ₄) ₂ SO ₄	3,37	666	197,6	15,53	8,7
Exclusão molecular	0,360	305	847,3	7,11	37,5
Ultrafiltração	0,317	260	820,4	6	36,3
DEAE-Sephadex	0,0374	145,2	3924	3,3	174

4.1. Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida

As preparações protéicas das diferentes etapas de purificação foram submetidas à eletroforese em gel SDS-poliacrilamida 12 % e coradas com nitrato de prata (Figura 5)

Este tipo de gel fornece condições para monitorar as etapas de purificação das proteínas, observando o decréscimo do número de bandas protéicas à medida que a purificação aumenta (LEHNINGER et al., 1995).

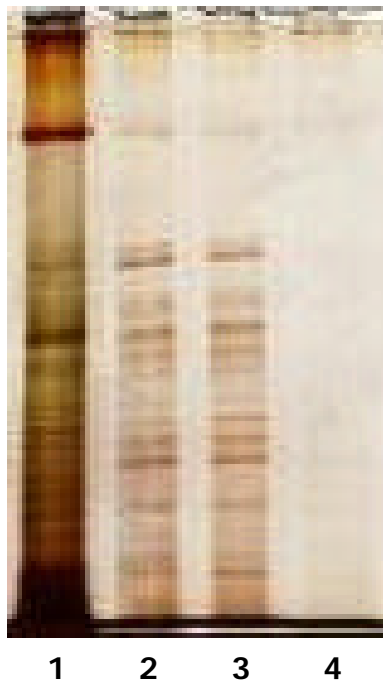


Figura 5. Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida 12 %, corado com nitrato de prata. 1. Sobrenadante da cultura; 2. Pós-coluna de exclusão molecular; 3. Pós-ultrafiltração; 4. Pós-coluna de troca iônica.

4.2. Determinação da temperatura ótima de atividade da xilanase parcialmente purificada

A determinação da temperatura ótima da xilanase de *P. expansum* está representada na Figura 6. A determinação da atividade em temperaturas, variando entre 20 °C e 70 °C, demonstrou que a temperatura ótima da enzima é 40 °C.

As xilanases de origem fúngica normalmente mostram atividade ótima em torno de 50 °C, sendo inativadas em temperatura superior a 65 °C (DEKKER e RICHARDS, 1976; GASPAR et al., 1997).

KITAMOTO et al. (1999) encontraram temperatura ótima de 60 °C em seu trabalho de purificação e caracterização de xilanase produzida por *Aspergillus oryzae*, SHERIEF (1990) encontraram temperatura ótima de 55 °C em seu trabalho de caracterização de xilanase produzida por *Aspergillus flavipes*.

As enzimas, em geral, apresentam atividade máxima em determinada temperatura. A temperatura pode modificar a estrutura da proteína de forma que seu sítio ativo permaneça mais exposto, aumentando a atividade enzimática (LEHNINGER et al., 1995).

O aumento da temperatura resulta em elevação do número de moléculas com energia suficiente para sobrepor a barreira energética, por meio da diminuição da energia de ativação. Por outro lado, temperaturas altas promovem a desnaturação enzimática e, conseqüentemente, a perda da atividade da enzima (LEHNINGER et al., 1995).

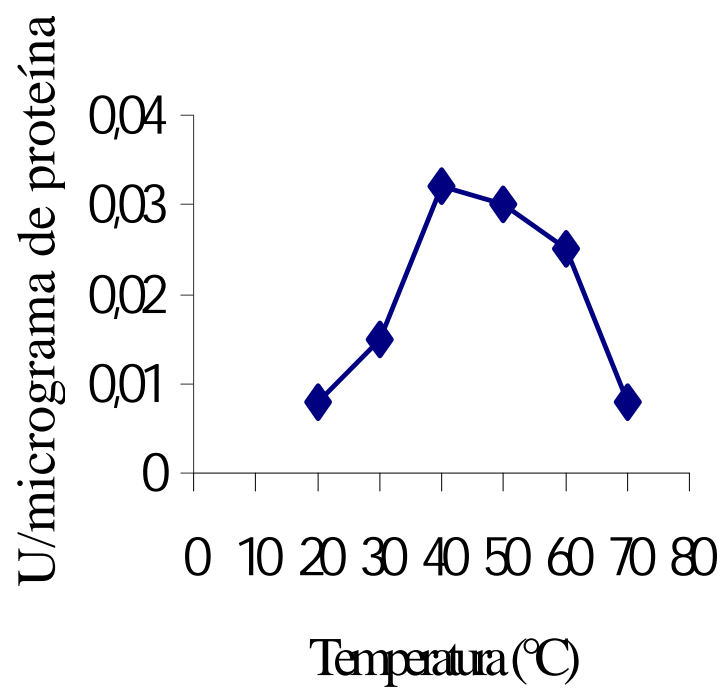


Figura 6. Efeito da temperatura sobre a atividade da xilanase de *P. expansum*, em pH 5,0.

4.3. Determinação do pH ótimo de atividade da xilanase parcialmente purificada

A determinação do pH ótimo de atividade da xilanase está representada na Figura 7. O pH ótimo de atividade da xilanase de *Penicillium expansum* foi 5,5. Este valor está situado dentro da faixa de estabilidade da enzima, apresentado na Figura 9.

Resultados semelhantes foram observados para outros microrganismos. *Penicillium chrysogenum* (HAAS et al., 1992) e *Aspergillus fischeri* Fxn1 (CHANDRA et al., 1996) também apresentaram xilanases com atividades máximas em pH ácido. KITAMOTO et al. (1999) encontraram pH ótimo de 5,0 em seu trabalho de purificação e caracterização de xilanase produzida por *Aspergillus oryzae*. SHERIEF (1990) encontraram pH ótimo de 5,0 para xilanase de *Aspergillus flavipes*.

As xilanases de origem fúngica, geralmente, são mais ativas em pH que oscila entre 3,5 e 5,5 e são estáveis em ampla faixa de pH, usualmente de 3 a 10. Por outro lado, o pH ótimo das xilanases bacterianas oscila entre pH 5,0 e 7,5 (DEKKER e RICHARDS, 1976; WONG et al., 1988).

As enzimas em geral apresentam atividade máxima em determinado pH. Em valores de pH maiores ou menores que este, sua atividade diminui. Cadeias laterais de alguns aminoácidos agem como ácidos ou bases fracas, realizando funções críticas no sítio ativo da enzima. Assim, mudanças de ionização destas cadeias causam mudanças na atividade enzimática (LEHNINGER et al., 1995).

O pH pode influenciar diretamente a atividade enzimática por meio de mudanças nas cargas de aminoácidos essenciais, como aqueles situados no sítio ativo da enzima, ou nos sítios de ligação, acarretando maior ou menor afinidade da enzima para com o substrato (LEHNINGER et al., 1995). Mudanças de pH afetarão profundamente o caráter iônico dos aminogrupos e dos grupos carboxílicos da proteína, afetando marcadamente, portanto, o sítio catalítico e a conformação de

uma enzima. Além dos efeitos puramente iônicos, valores baixos ou altos de pH podem causar desnaturação considerável e conseqüentemente inativação da proteína enzimática. Ademais, uma vez que muitos substratos têm caráter iônico (por exemplo, ATP, NAD⁺, aminoácidos e CoASH), o sítio ativo da enzima pode requerer espécies iônicas determinadas para atingir atividade ótima. Esses efeitos são provavelmente os principais determinantes de uma típica relação atividade enzimática-pH (CONN e STUMPF, 1987).

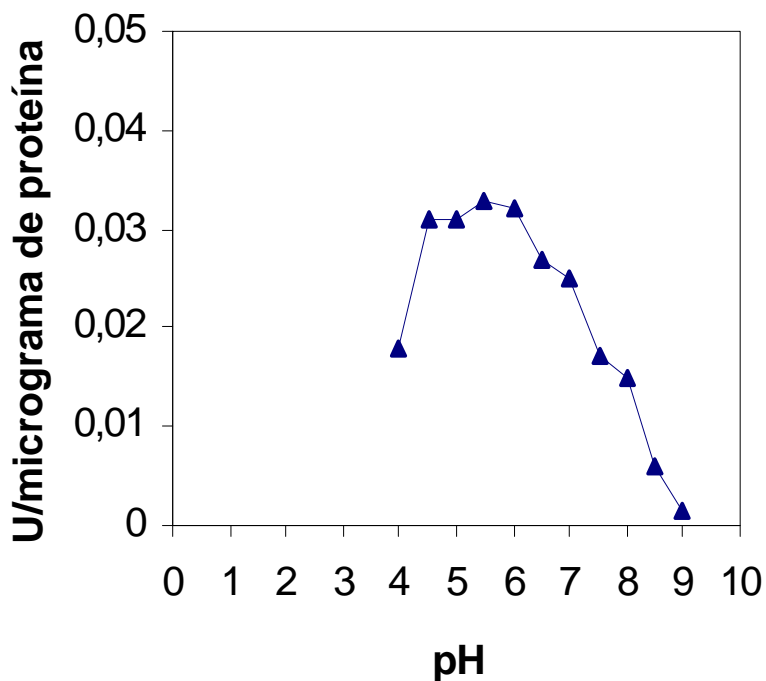


Figura 7. Efeito do pH sobre a atividade da xilanase de *P. expansum*, em temperatura de 40 °C.

Várias xilanases de bactérias alcalófilas ou alcalitolerantes têm sido estudadas com o intuito de serem usadas no processo de despolpamento da celulose na indústria de papel (NAKAMURA et al., 1993). Estes autores observaram que não há atividade de celulase em filtrado da cultura produzido pela bactéria alcalófila *Bacillus* sp. estirpe 41M-1; portanto, este filtrado não necessita ser purificado para o tratamento da polpa.

4.4. Estabilidade térmica da xilanase

A estabilidade térmica da xilanase parcialmente purificada foi avaliada por determinação da atividade remanescente, após pré-incubação da enzima em PPB 0,05 M, pH 5,5 em temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C por 1 h, como mostrado na Figura 8. A atividade da enzima sem pré-incubação foi considerada como 100 %.

A xilanase de *P. expansum* apresentou-se estável quando pré-incubada por uma hora, em temperaturas de 20 °C, 30 °C e 40 °C. Nas temperaturas de 50 °C, 60 °C e 70 °C, a enzima manteve 48 %, 39 % e 34 % da atividade máxima, respectivamente.

O decréscimo na atividade enzimática, observado a partir de 40 °C, pode ser resultante da inativação térmica da enzima. O mesmo ocorreu com poligalacturonases (PG) produzida por *Trichoderma reesei* QM 9414, que foi inativada quando mantida por uma hora a temperaturas acima de 45 °C (DEKKER, 1993). Segundo este autor, a estabilidade térmica à temperaturas elevadas pode ser aumentada com a adição de 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA). A altas temperaturas, BSA previne significativamente a inativação enzimática.

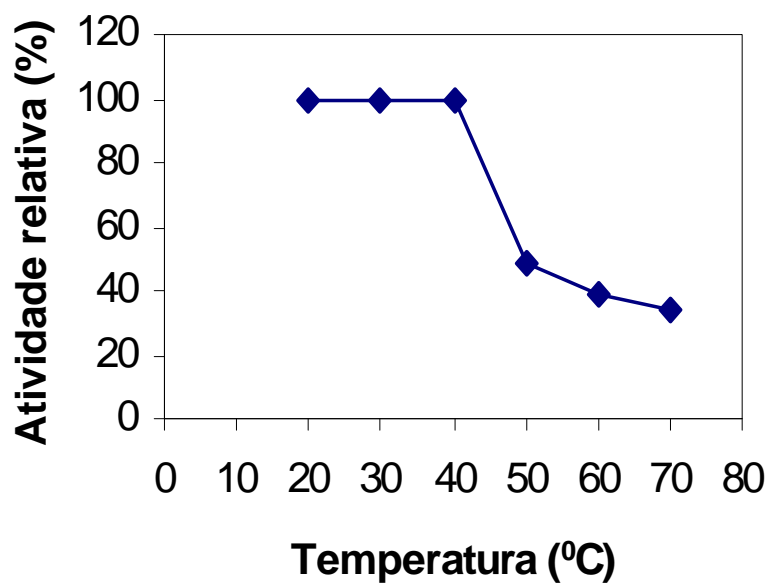


Figura 8. Estabilidade térmica da xilanase de *P. expansum* em diferentes temperaturas após 1 h de pré-incubação. A atividade foi determinada a 40 °C e pH 5,5.

O valor de $T_{1/2}$ (tempo em minutos, em que se observa 50 % da atividade enzimática máxima) estimado para a xilanase incubada a 50 °C, foi de aproximadamente 490 min (CHANDRA et al., 1996).

De acordo com KESKAR (1992), a termoestabilidade da enzima é característica desejável para as enzimas industriais. Enzimas termoestáveis, em geral, são de grande interesse biotecnológico apresentando algumas vantagens para os processos industriais como maior produtividade, eficiência e menores chances de contaminação (GILBERT et al., 1992).

Algumas xilanases são termoestáveis, permitindo seu uso em altas temperaturas, o que é ideal na prevenção de contaminação bacteriana e no aumento da eficiência de hidrólise. Além disso, enzimas estáveis são mais facilmente estocadas, manuseadas e transportadas em temperatura ambiente e recicladas eficientemente (MARGARITIS e MERCHANT, 1984).

4.5. Estabilidade em relação ao pH

A enzima foi convenientemente diluída em tampão Tris/acetato de potássio/fosfato de potássio 50 mM. Os valores de pH variaram na faixa de 4,0 a 9,0, com intervalo de 0,5 unidade de pH. A enzima foi pré-incubada em presença de 1 mg/mL de BSA durante 1 h, em gelo e tampão Tris/acetato de potássio/fosfato de potássio 50 mM. O pH foi ajustado com NaOH 2 M ou HCl 2 M. Posteriormente à pré-incubação, foi realizada a dosagem em pH e temperatura ótimos, para determinação da atividade enzimática remanescente (Figura 9). A atividade da enzima sem pré-incubação foi considerada como 100 %.

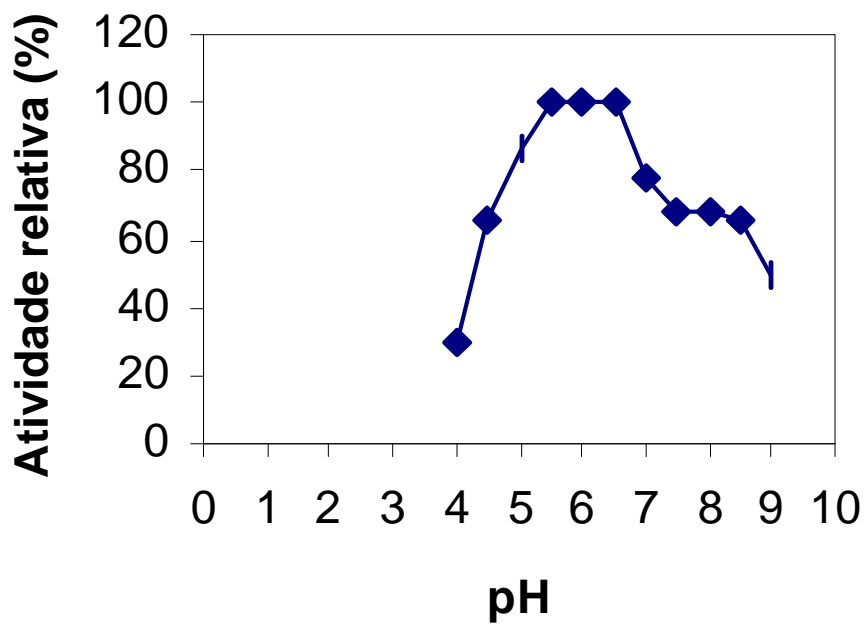


Figura 9. Estabilidade da xilanase de *P. expansum*, em diferentes pH, após 1h de pré-incubação. A atividade foi determinada em pH 5,5 e 40 °C.

A xilanase parcialmente purificada mostrou-se estável quando pré-incubada em pH na faixa de 5,5-6,5. Em pH 7,0, 5,0 e 4,5 manteve 78 %, 87 % e 65 % da atividade máxima da enzima, respectivamente. Quando pré-incubada em pH 7,5, 8,0 e 8,5, manteve 68 % da atividade máxima da enzima. Em pH 9,0 permaneceu com 50 % da atividade máxima e em pH 4,0 manteve apenas 30 %.

A xilanase produzida por *Thermophilus* alcali-tolerantes mostrou-se estável em pH 5,5-9,5 (cepa SP) e pH 6,0-7,5 (cepa BC), após 30 minutos a 60 °C (PLAMEN et al., 1997).

4.6. Efeito de íons sobre a atividade enzimática

O efeito dos íons Mg^{+2} e Al^{+3} , presentes em $Mg_3(PO_4)_2$ (concentração final de 1 mM), $MgSO_4$ (1 mM) e $Al_2(SO_4)_3$ (1 mM), sobre a atividade da xilanase foi avaliado através da adição dos mesmos ao substrato xilana, nos pH e temperatura ótimos. O Quadro 5 mostra o efeito de íons sobre a atividade da xilanase de *P. expansum*.

O íon Mg^{+2} aumentou a atividade da enzima em 34 %, quando em $Mg_3(PO_4)_2$ (1 mM) e 31 % quando em $MgSO_4$ (1 mM). O íon Al^{+3} presente em $Al_2(SO_4)_3$ (1 mM) aumentou a atividade da enzima em 28 %.

Para xilanases de *Aspergillus fischeri* Fxn1, o íon Mg^{+2} (10 mM) não alterou a atividade xilanolítica e o $AlCl_3$ (10 mM) promoveu um decréscimo de 95 % da atividade ótima (CHANDRA et al., 1996).

GHAREIB (1992) demonstraram que de Zn^{+2} , Cu^{+2} , K^{+1} e Co^{+2} aumentaram a atividade xilanolítica de *Aspergillus terreus* e que $HgCl_2$, 2,4-dinitrophenol (DNP) e diamino etileno tetra ácido acético (EDTA) inibiram fortemente a atividade xilanolítica, todos na concentração 1mM.

Quadro 5. Efeito de íons sobre a atividade da xilanase de *P. expansum* parcialmente purificada.

Composto adicionado (1 mM)	Atividade relativa (%)
Controle (sem adição)	100
Mg ₃ (PO ₄) ₂	134
MgSO ₄	131
Al ₂ (SO ₄) ₃	128

Aproximadamente um terço das enzimas conhecidas possuem metais como parte de sua estrutura, requerem a adição de metais para sua atividade ou são mais ativas na presença de metais. No primeiro caso, os metais fazem parte da estrutura molecular da enzima e não podem ser removidos sem destruir a estrutura. Tais enzimas incluem as metaloflavoproteínas, os citocromos e as ferro-proteínas não-hêmicas (ferredoxinas). Em outras situações, os metais reagem reversivelmente com proteínas para formar complexo metal-proteína, que constituem o catalisador ativo. Em muitas oportunidades, o complexo representa uma conformação específica, cataliticamente ativa da proteína, na qual o papel do metal parece ser o de estabilizar a conformação. Os metais se assemelham aos prótons (H⁺) quanto ao fato de serem eletrofilicos, pois são capazes de aceitar um par de elétrons para formar uma ligação química. Ao fazerem isto, os metais atuam como ácidos gerais para reagir com ligantes aniônicos e neutros. Seu tamanho relativamente grande em relação aos

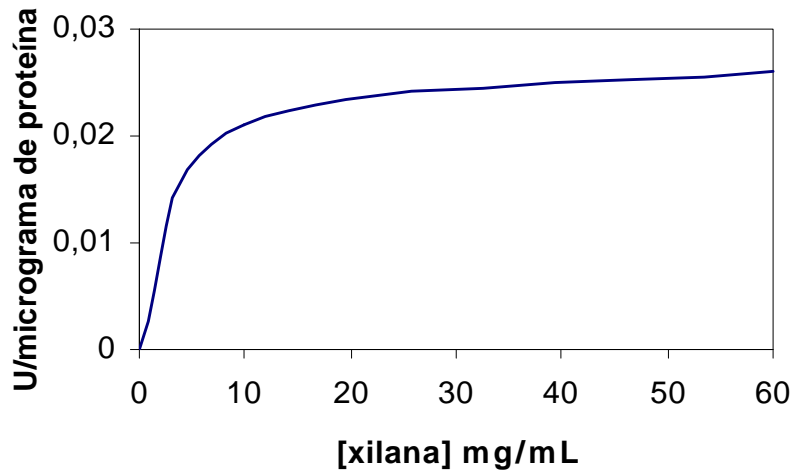
prótons constitui uma desvantagem, mas isto é compensado pela sua capacidade de reagir com mais de um ligante. Em geral os íons metálicos reagem com 2, 4 ou 6 ligantes (CONN e STUMPF, 1987).

4.7. Estudo cinético

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da xilanase parcialmente purificada foram determinados utilizando o método dos duplos-recíprocos (LINEWEAVER e BURK, 1934). A xilanase comporta-se como uma enzima tipicamente Michaeliana, já que a representação gráfica dos duplos-recíprocos apresentou-se linear, como mostra a Figura 10-B. As constantes foram determinadas para o substrato xilana "oat spelt". Os valores encontrados para K_m e V_{max} foram respectivamente de 3,03 mg de xilana mL^{-1} e 0,027 μ moles de açúcar redutor $min^{-1} \mu g^{-1}$ de proteína.

Em trabalho realizado com *Penicillium* sp. crescido em meio extremamente ácido, pH 2,0 e xilana como única fonte de carbono, KIMURA (2000) demonstrou a produção de isoformas de xilanase. Foi observado que as isoformas de xilanase possuem diferenciados valores de K_m e V_{max} . Genes de xilanase de bactérias e fungos têm sido seqüenciados, e uma seqüência de nucleotídeos é conservada nos genes desses diferentes organismos. O autor atribuiu a essa seqüência o domínio catalítico ou o sítio de ligação do substrato ou as duas juntas. A presença do aminoácido histidina nesta região é altamente conservada em todas as xilanases, o que sugere que ele pode estar envolvido em funções catalíticas.

A



B

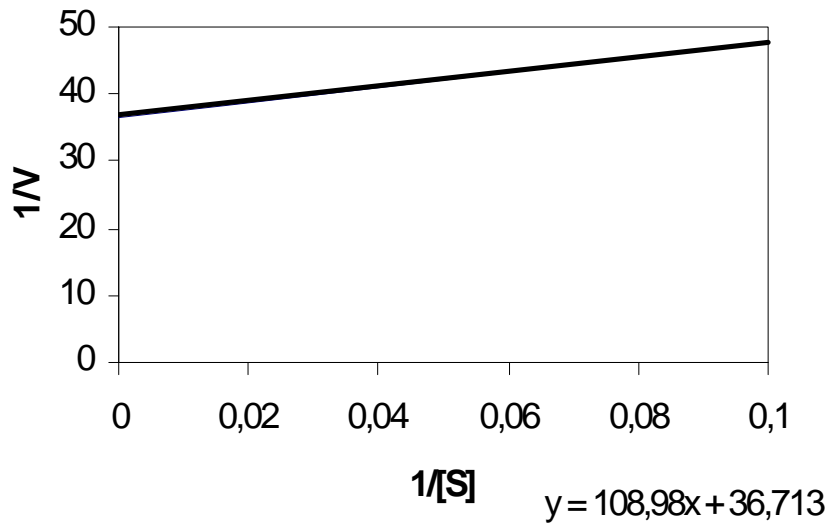


Figura 10. A-Cinética da hidrólise de xilana pela xilanase.
B-Representação gráfica de Lineweaver-Burk.

O valor de K_m da principal xilanase do fungo álcali tolerante *Aspergillus fischeri* Fxn1 (CHANDRA et al., 1996), foi de 4,88 mg de xilana mL⁻¹ e V_{max} de 0,058 μ moles de açúcar redutor min⁻¹ μ g⁻¹ de proteína.

Da mesma forma, os valores de K_m da xilanase de *Acrophialophora nainiana*, determinados em xilana 'birchwood' solúvel e insolúvel foram de 40,9 e 16,1 mg de xilana mL⁻¹, respectivamente (SALLES et al., 2000).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O fungo *Penicillium expansum* foi selecionado para este trabalho por ser produtor de enzimas xilanolíticas e apresentar baixa atividade de celulase constitutiva.

A xilanase do sobrenadante da cultura foi concentrada por liofilização e purificada por fracionamento com sulfato de amônia, seguido por cromatografia de exclusão molecular, ultrafiltração e cromatografia de troca iônica.

A xilanase foi eluída em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25 e purificada 37,5 vezes com recuperação de 7,1 % da atividade absoluta inicial. Em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A-50, a xilanase foi eluída com força iônica de 0,1 M de NaCl e purificada 174 vezes com recuperação de 3,3 % da atividade absoluta inicial. Em ambos os processos cromatográficos foram observados a eluição de apenas um pico de atividade enzimática.

A enzima apresentou temperatura e pH ótimos de 40 °C e 5,5, respectivamente. A estabilidade em relação ao pH ocorreu em valores de pH entre 5,5-6,5 e a termoestabilidade entre 20-40 °C.

A atividade enzimática foi aumentada 34 % por $Mg_3(PO_4)_2$ (1 mM); 31 % por $MgSO_4$ (1 mM) e 28 % por $Al_2(SO_4)_3$ (1 mM).

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados utilizando xilana "oat spelt" como substrato. Os valores obtidos foram respectivamente $3,03 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,027 \text{ } \mu\text{moles de açúcar redutor min}^{-1} \text{ } \mu\text{g de proteína}^{-1}$.

A eletroforese em gel SDS-poliacrilamida 12 % corado com nitrato de prata, mostrou a evolução da purificação parcial, com a redução do número de bandas de proteína, a cada etapa da purificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M. J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, p.380-389, 1991.
- BELANCIC A.; SCARPA J.; PEIRANO A.; DIAZ R.; STEINER J.; EYZAGUIRRE J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. **Journal Biotechnology**, jul 15;41(1):71-79, 1995.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic enzymes. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.11, p.286-290, 1985.
- BIELY, P.; MACKENZIE, C. R.; PULS, J.; SCHNEIDER, H. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. **Biotechnology**, v.4, p. 731-733, 1986.
- BISARIA V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, p.90-104, 1981.
- BISWAS, S. R.; JANAS, S. C.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Production, purification and characterization of xylanase from hyperxylanolytic mutant *Aspergillus ochraceus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.244-251, 1990.

- 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.
- CHANDRA, T. S; CHANDRA, K. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. **FEMS Microbiol. Lett.** 145: p.457-461, 1996.
- CHRISTOV, L .P.; PRIOR, B. A. Enzymatic prebleaching of sulphite pulps. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.42, p.492-498, 1994.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica** . Editora Edgard Blücher Ltda, 1987.
- COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases. In: VISSER, J. (Ed). **Xylan and Xylanases**. Elsevier, Amsterdam, 1992.
- CUROTTO, E.; NAZAL, A.; AGUIRRE, C.; CAMPOS, V.; DURÁN, N. Enzymatic Pretreatment of Kraft Pulps from *Pinus radiata* with Xylanolytic Complex of *Penicillium canescens* (CP1) Fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.73, p.29-42, 1998.
- CUROTTO, E.; CONCHA, M.; CAMPOS, V.; MILAGRES, A.M.F.; DURÁN, N. Production of extracellular xylanases by *Penicillium janthinellum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.48, p.107-116, 1994.
- DE RONZO, D. J. In. **Energy from Bioconversion of Waste Materials**. Noyes Data Corporation, Park Ridge. New Jersey, USA, 1977.
- DEKKER, R. F. H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.1127-1146, 1993.
- DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. Hemicelluloses: their occurrence purification, properties and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.32, p.277-352, 1976.
- DEY, P. M.; BRINSON, K. Plant cell-wall. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.42, p.265-294, 1984.

- FADEL, M.; FOU DA, M. S. Physiological studies on xylanase production by *Penicillium funiculosum* on some agricultural wastes. **Zentralblatt für Mikrobiologie.**, v.148, n.4, p.304-312, 1993.
- FERREIRA, M. H. Atividade xilanolítica de *Penicillium griseoroseum* cultivado em resíduo lignocelulósico. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola.** Universidade Federal de Viçosa, MG, 50p., 1999.
- FERREIRA-FILHO, E. X. The Xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**, v. 27, p. 1093-1109, 1994.
- FERREIRA-FILHO, E. X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-1,4- β -D-xylanases isolated from solid state cultures of *Penicillium capsulatum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.11, p.171-180, 1993.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.; PIÑAGA, F.; de GRAAFF, L.; VISSER, J.; RAMÓN, D.; VALLÉS, S. Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.42, p.555-562, 1994.
- GASPAR, A.; COSSON, T.; ROQUE, C.; THONART. Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10c. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.67, p.45-67, 1997.
- GHAREIB M. Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*. **Zentralbl Mikrobiologie** Nov; 147(8): 569-76, 1992.
- GHOSH M. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. **Applied Environmental Microbiology**. dec; 60(120); 4620-3,1994.
- GIBSON, T. S.; McCLEARY, B. V. A simple procedure for the large-scale purification of β -xylanase from *Trichoderma viride*. **Carbohydrate Polymers**, v.7, p.225-240, 1987.
- GILBERT, M.; BREU, C.; AGUCHI, M.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a xylanase from the thermophilic ascomycete *Thielavia terrestris* 255B. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34/35, p.247-259, 1992.
- GODFREY, T.; WEST, S.I. **Introduction to industrial enzymology**. In: Godfrey, T., West, S. (Ed), *Industrial Enzymology*. 2nd ed. MacMillam Press LTD, 609p., 1996.

- GORBACHEVA, I. V.; RODIONOVA, N. A. Studies on xylan-degrading enzymes. II. Action pattern of endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* str.14 on xylan and xylooligosaccharides. **Biochemistry Biophysics Acta**, v.484, p.94-102, 1977.
- GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Enzymatic liquefaction of apples. **Fruit Processing**, v.7, p.242-245, 1993.
- HAAS, H.; HERFURTH, E.; STÖFFLER, G.; REDL, B. Purification, characterization and partial aminoacid sequences of xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1117, n.3, p.279-286, 1992.
- HALTRICH, D.; PREISS, M.; STEINER, W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.15, p.854-860, 1993.
- INGRAM, L. O.; BURCHHARDT, G. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, 1128-1133, 1992.
- KADOWAKI, M. K.; SOUZA, C. G. M.; SIMÃO, R. C. G.; PERALTA, R. M. Xylanase Production by *Aspergillus tamarii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.66, p.97-106, 1997.
- KELLY, C. T.; O MANHONY; M. R., FOGARTY, W. M. Extracellular xylanolytic enzymes of *Paecilomyces varioti*. **Biotechnology Letters**, v.11, n.12, p. 885-890, 1989.
- KESKAR, S. S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T 7: cultural conditions and enzyme properties **Biotechnology Letters**, v.14, n.6, p.481-486, 1992.
- KIMURA T. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** jun; 64(6):1230-7, 2000.
- KIMURA, I.; TAJIMA, S. The modes of action of two endo-1,4- β -D-xylanases from *Aspergillus sojae* on various xiligosaccharides. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.3, p.283-288, 1998.
- KITAMOTO N.; YOSHINO S.; OHMIYA K.; TSUKAGOSHI N. Purification and characterization of overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** oct.; 63(10):1791-4., 1999.

- KHASIN, A.; ALCHANATI, I.; SHOHAM, Y. Purification and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1725-1730, 1993.
- LADISCH, M. R. Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, v.14, n.1, p.21-25, 1979.
- LAEMMELI, U. K. Cleavage of estrututal protein during the assembly of the read of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, 1970.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. ed. São Paulo: SARVIER, 839 p.,1995.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemical Sociedad**, v.56, p.658-666, 1934.
- MARGARITIS, A.; MERCHANT, R. Production and therma stability characteristics of cellulase and xylanase enzymes from *Thielavia terrestris*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.13, p.299-341, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-431, 1959.
- MISHRA, C.; FORRESTER, I. T.; KELLY, B. D.; BURGESS, R. R.; LEATHAM, G. F. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.33, p.226-232, 1990.
- MUTSAERS, J. H. G. M. Xylanase in breadmaking. In: Xylans and xylanases **International Symposium**. Wageningen, The Netherlands, Novo Nordisk, v.48: p.8-11, 1991.
- NAKAMURA, S.; WAKABAYASHI, K.; NAKAI, R.; AONO, R.; HORIKOSHI, K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* strain 41M-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.7, p.2311-2316, 1993.
- NOÉ, P.; CHEVALIER, J.; MORA, F.; COMTAT, J. Action of xylanases on chemical pulp fibers. Part II. Enzymatic beating. **Journal Wood Chemistry Technology**, v.6, p.167-184, 1986.

- PALMA, M. B. Influência da agitação e da aeração na síntese de xilanase por *Penicillium janthinellum*. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa, MG, 73p., 1993.
- PILON, P.; BARBE, M. C.; DESROCHERS, M; JURASEK, B; NEUMAN, P. J. Fungal treatment of mechanical pulps-it effect on paper properties. **Biotechnology Bioengineering**, 24: 2063-2076, 1992.
- PINHEIRO, V. D. Produção e caracterização parcial de xilanasas de *Penicillium expansum*. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola**. Universidade federal de viçosa, MG, 60p., 1999.
- PLAMEN, L. D.; MARGARITA, S, K; ROSSICA, D. M.; ELKA, I. E. Isolation and characterization of xylan-degrading alkali-tolerant thermophiles **FEMS Microbiology Letters**. 157: 27-30, 1997.
- PULS, J.; POUTANEN, K. Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: COUGHLAN, M. P. (Ed). **Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation**. Elsevier Applied Science, London, p. 151-165, 1989.
- ROGERS, H. J.; PERKINS, H. R. **Cell Walls and Membranes**, Spon, London, 1968.
- SALLES, B. C; CUNHA, R. B; FONTES, W.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal Biotechnology**. Aug 25; 81(2-3): 199-204, 2000.
- SHARMA, H. S. S. Screening of polysacchacaride-degrading enzymes for retting flax stem. **Inter. Biodeterioration.**, v.23, p.181-186, 1987.
- SHERIEF A. A. Separation and some properties of an endo-1,4-beta-D-xylanase from *Aspergillus flavipes*. **Acta Microbiology Hung**, 37(3): 301-6, 1990
- SINGH, P. S. **Priciples of pulp bleaching**. In P. S. Singh (Ed.), The bleaching of pulp, 3rd ed. Tappi Press, Atlanta, p.15-28, 1979.
- TALMADGE, K. W.; KEEGSTRA, K.; BAUER, W. D.; ALBERSHEIM, P. **Plant Physiology**, v.51, p.158-173, 1973.
- TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, n.8, p.689-692, 1987.

- TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, p.566-574, 1992.
- THOMSEN, K.; NOVA NORDISK A/S. **Enzymes in the detergent industry**. Australian Chemical Specialities Manufacturers Association (ACSMA), Third National Convention, Sydney, July, 1989.
- TSAO, G. T. Structures of Cellulosic Materials and their Hydrolysis by Enzymes. In: ALANI, D. I.; MOO-YOUNG, M. (Ed). **Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology**. Elsevier Applied Science Publishers, London, p. 205-212, 1986.
- VAN DER BROECK, H. C.; DE GRAAF, L. L ; HILLE, J. D. R.; VAN OOYEN, A. J. J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. **Europium Patology Applied**, 90: 202-220, 1990.
- VIIKARI, L.; SUNDQUIST, J.; KETTUNEN, J. Xylanase enzymes promote pulp bleaching. **Paper and Timber**, v.73, p.384-389, 1991.
- WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.36, p.215-264, 1979.
- WONG , K .K. Y.; TAM, L. U. L; SADDLER, J. N. Multiplicity of 1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, 52: 305-317, 1988.
- YINBO, Q.; PEIJI, G.; DONG, W.; XIN, Z.; XIAO, Z. Production, Characterization, and Application of the Cellulase-Free-Xylanase from *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry an Biotechnology**, v.57/58, p.375-381, 1996.