



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**  
**Departamento de Engenharia de Alimentos**

**Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a  
partir de leveduras silvestres**

**Felipe Bastos Motta**  
Engenheiro de Alimentos

**Orientador:** Prof. Francisco Maugeri Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP

Março de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

858t Motta, Felipe Bastos  
Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres / Felipe Bastos Motta. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Francisco Maugeri Filho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Xilanase. 2. Caracterização. 3. Leveduras - Seleção. 4. Xilana. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(fea/cars)

Titulo em inglês: Screening, selection, production and characterization of the enzyme xylanase from wild yeasts

Palavras-chave em inglês (Keywords): Xylanase, Characterization, Yeasts - Selection, Xylan

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Gabriela Alves Macedo

Telma Teixeira Franco

Saartje Hernalsteens

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
Orientador – FEA/UNICAMP

---

Profa. Dr. Gabriela Alves Macedo  
Membro Titular – FEA/UNICAMP

---

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco  
Membro Titular – FEQ/UNICAMP

---

Dra. Saartje Hernalsteens  
Membro Titular – FEQ/UNICAMP

*“Eu acredito que os amigos são mais ou menos  
como anjos que levantam nossos pés quando  
nossas asas esquecem como se voa...”*

(Autor desconhecido)

Aos meus pais, *Plínio* e *Nágila*,  
à minha irmã, *Larissa*,  
ao meu amor, *Fernanda*,  
e ao meu filho, *Murilo*,  
dedico.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Plínio e Nágila, e à minha irmã Larissa por todo amor, carinho e apoio incondicionais. Sem vocês eu não teria chegado aqui! Amo muito vocês!

À Fernanda pelo amor, respeito, companheirismo e paciência.

Ao Professor Francisco Maugeri Filho pela orientação, incentivo, dedicação, confiança e ensinamentos.

Aos professores participantes da banca examinadora pelas valiosas correções, contribuições e sugestões.

À Professora Maria Isabel Rodrigues pelo apoio, incentivo e pelas horas dedicadas a este projeto.

À Fifa pelos conselhos, carinho e incondicional auxílio prestado durante todos os momentos na realização deste trabalho.

Ao Geraldo, Elizama, Rosana e Mônica pelas sugestões e ajuda na solução de problemas.

Aos colegas Marcus, Andrea, Raquel, Remi, Abraão, Eliane, Lílian, Rafael, Olga, Pedro, Angélica, Juliana e Maria Fernanda, do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pelas idéias, cooperação e pelo agradável ambiente de trabalho.

Aos amigos de pós-graduação Nenis, Fabi, Carol, Carioca, Marcão, Wagner, Mazutti, Caiçara, Colômbia, Alexandre, Folegatti e Carlinha pelo companheirismo, momentos de descontração durante as intermináveis horas de estudo, ajuda e por compartilharem as alegrias e frustrações durante a realização deste trabalho.

Aos amigos César, Rejane, Wellington, Fred, Vitor, Digulinho e Deive, conhecidos em Viçosa, que estiveram sempre presente na realização deste trabalho.

À minha querida avó, tios e primos, pela torcida e apoio.

À Capes, pelo apoio financeiro.

À Deus, sem o qual não seria possível a conclusão de mais esta etapa.

## Sumário

RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. <i>Leveduras</i> .....	2
2.2. <i>Xilana</i> .....	3
2.3. <i>Enzimas</i> .....	4
2.4. <i>Xilanase</i> .....	4
2.5. <i>Cinética Enzimática</i> .....	6
2.5.1. <i>Michaelis &amp; Menten</i> .....	7
2.5.2. <i>Lineweaver-Burk</i> .....	7
2.5.3. <i>Eadie-Hofstee</i> .....	8
2.5.4. <i>Efeito da temperatura na estabilidade e atividade da enzima</i> .....	8
2.5.5. <i>Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima</i> .....	10
2.5.6. <i>Termodinâmica de desnaturação enzimática</i> .....	10
2.5.6.1. <i>Energia Livre de Gibbs</i> .....	10
2.5.6.2. <i>Entalpia</i> .....	12
2.5.6.3. <i>Entropia</i> .....	12
2.6. <i>Planejamento experimental</i> .....	13
2.6.1. <i>Experimentos Fatoriais</i> .....	14
2.6.2. <i>Delineamento Composto Central (DCC)</i> .....	15
2.6.2.1. <i>Adição de pontos centrais</i> .....	15
2.6.2.2. <i>Adição de pontos axiais</i> .....	15
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. <i>Microrganismos utilizados</i> .....	18
4.2. <i>Método de screening em meio sólido</i> .....	18
4.2.1. <i>Meio de cultura</i> .....	18
4.2.2. <i>Seleção dos microrganismos produtores de xilanase</i> .....	19
4.3. <i>Purificação dos microrganismos pré-selecionados</i> .....	20
4.4. <i>Método de screening em meio líquido agitado</i> .....	21
4.4.1. <i>Meio sintético pobre</i> .....	21
4.4.2. <i>Meio sintético enriquecido</i> .....	22
4.5. <i>Métodos Analíticos</i> .....	22
4.5.1. <i>Estimativa da atividade da enzima xilanase</i> .....	22
4.5.2. <i>Curva padrão da quantidade de açúcar redutor</i> .....	23
4.6. <i>Caracterização da enzima xilanase</i> .....	23
4.6.1. <i>Temperatura e pH ótimos</i> .....	23
4.6.2. <i>Estabilidade térmica</i> .....	24
4.6.3. <i>Estabilidade em relação ao pH</i> .....	24
4.6.4. <i>Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática</i> .....	25

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1. <i>Screening em meio sólido</i> .....	26
5.2. <i>Purificação dos microrganismos pré-selecionados</i> .....	28
5.3. <i>Screening em meio líquido agitado</i> .....	29
5.3.1. <i>Meio sintético pobre</i> .....	29
5.3.2. <i>Meio sintético enriquecido</i> .....	35
5.4. <i>Caracterização da enzima xilanase produzida pela cepa AAD<sub>5</sub></i> .....	41
5.4.1. <i>Determinação da temperatura e pH ótimos</i> .....	41
5.4.1.1. <i>Primeiro planejamento, utilizando tampão citrato 50 mM</i> .....	41
5.4.1.2. <i>Segundo planejamento, utilizando tampão fosfato 50mM</i> .....	44
5.4.1.3. <i>Terceiro planejamento</i> .....	46
5.4.2. <i>Estabilidade térmica</i> .....	49
5.4.3. <i>Estabilidade a diferentes pH</i> .....	52
5.4.4. <i>O efeito da concentração do substrato em relação à ação da enzima</i> .....	55
5.5. <i>Caracterização da enzima xilanase produzida pela cepa AY<sub>10</sub></i> .....	58
5.5.1. <i>Determinação da temperatura e pH ótimos</i> .....	58
5.5.2. <i>Estabilidade térmica</i> .....	62
5.5.3. <i>Estabilidade a diferentes pH</i> .....	65
5.5.4. <i>O efeito da concentração do substrato em relação à ação da enzima</i> .....	66
6. CONCLUSÕES .....	70
7. BIBLIOGRAFIA .....	72



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas.....	5
<b>Figura 2.</b> Especificidade da xilanase.....	6
<b>Figura 3.</b> Número de artigos publicados, a cada quinquênio, que utilizaram planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta (Base de dados Food Science and Technology Abstracts – FSTA).....	14
<b>Figura 4.</b> Representação da placa de Petri dividida em 3 quadrantes.....	19
<b>Figura 5.</b> Técnica de screening para microrganismos produtores de xilanase. Os halos trans-parentes indicam a hidrólise da xilanase devido à atividade xilanolítica (Breccia et al., 1995).....	20
<b>Figura 6.</b> Placa de Petri com a técnica de esgotamento para isolamento de leveduras.....	21
<b>Figura 7.</b> Placa de Petri com o resultado obtido durante o processo de screening em meio sólido.....	26
<b>Figura 8.</b> Proporção dos microrganismos produtores de xilanase em cada região.....	27
<b>Figura 9.</b> Quantidade de microrganismos classificados de acordo com o IEA.....	27
<b>Figura 10.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD <sub>5</sub> em meio pobre.....	29
<b>Figura 11.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAF <sub>4</sub> em meio pobre.....	30
<b>Figura 12.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AB <sub>05</sub> em meio pobre.....	30
<b>Figura 13.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AF <sub>4</sub> em meio pobre.....	31
<b>Figura 14.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AY <sub>10</sub> em meio pobre.....	31
<b>Figura 15.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AZ <sub>15</sub> em meio pobre.....	32
<b>Figura 16.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo J <sub>06</sub> em meio pobre.....	32
<b>Figura 17.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo Q <sub>03</sub> em meio pobre.....	33
<b>Figura 18.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo T <sub>05</sub> em meio pobre.....	34
<b>Figura 19.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AB <sub>05</sub> em meio enriquecido.....	35
<b>Figura 20.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AZ <sub>15</sub> em meio enriquecido.....	36
<b>Figura 21.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAF <sub>4</sub> em meio enriquecido.....	36

<b>Figura 22.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AF <sub>4</sub> em meio enriquecido. ....	37
<b>Figura 23.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo J <sub>06</sub> em meio enriquecido. ....	37
<b>Figura 24.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo T <sub>05</sub> em meio enriquecido. ....	38
<b>Figura 25.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo Q <sub>03</sub> em meio enriquecido. ....	38
<b>Figura 26.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AY <sub>10</sub> em meio enriquecido. ....	39
<b>Figura 27.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD <sub>5</sub> em meio enriquecido. ....	39
<b>Figura 28.</b> Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD <sub>5</sub> em meio enriquecido. ....	40
<b>Figura 29.</b> Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado no primeiro delineamento experimental para o microrganismo AAD <sub>5</sub> . ....	43
<b>Figura 30.</b> Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD <sub>5</sub> no primeiro delineamento experimental. ....	44
<b>Figura 31.</b> Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD <sub>5</sub> no segundo delineamento experimental. ....	45
<b>Figura 32.</b> Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado do terceiro delineamento experimental para o microrganismo AAD <sub>5</sub> . ....	48
<b>Figura 33.</b> Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD <sub>5</sub> no terceiro delineamento experimental. ....	49
<b>Figura 34.</b> Efeito da temperatura em função do tempo de incubação da xilanase do microrganismo AAD <sub>5</sub> , para o cálculo da constante de desativação para temperatura de 60°C. ....	51
<b>Figura 35.</b> Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AAD <sub>5</sub> em função do pH de incubação. ....	55
<b>Figura 36.</b> Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AAD <sub>5</sub> . ....	56
<b>Figura 37.</b> Linearização de Lineweaver-Burk no gráfico de <i>v</i> versus <i>S</i> da enzima produzida pelo microrganismo AAD <sub>5</sub> . ....	57
<b>Figura 38.</b> Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AAD <sub>5</sub> gerado pelo programa Statistica. ....	58

<b>Figura 39.</b> Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado do delineamento experimental para o microrganismo AY <sub>10</sub> . ....	60
<b>Figura 40.</b> Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AY <sub>10</sub> . .....	61
<b>Figura 41.</b> Atividade enzimática da xilanase produzida pela cepa AY <sub>10</sub> em função da temperatura, com pH fixo em 4,8. ....	61
<b>Figura 42.</b> Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AY <sub>10</sub> em função do pH de incubação.....	66
<b>Figura 43.</b> Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelos microrganismos AY <sub>10</sub> e AAD <sub>5</sub> em função do pH de incubação.....	66
<b>Figura 44.</b> Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AY <sub>10</sub> . ....	67
<b>Figura 45.</b> Linearização de Lineweaver-Burk no gráfico de <i>v</i> versus <i>S</i> da enzima produzida pelo microrganismo AY <sub>10</sub> .....	68
<b>Figura 46.</b> Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AY <sub>10</sub> gerado pelo programa Statistica.....	69

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de $\alpha$ em função de k.....	16
<b>Tabela 2.</b> Regiões na qual foram isolados os microrganismos.....	18
<b>Tabela 3.</b> Valores utilizados em cada nível do DCCR para o microrganismo AAD <sub>5</sub> utilizando tampão Citrato 50 mM para modificação do pH.....	24
<b>Tabela 4.</b> Valores utilizados em cada nível do DCCR para o microrganismo AAD <sub>5</sub> utilizando tampão Fosfato 50 mM para modificação do pH.....	24
<b>Tabela 5.</b> Valores utilizados em cada nível do DCCR para os microrganismos AAD <sub>5</sub> e AY <sub>10</sub> utilizando tampão citrato 50 mM para modificação do pH.....	24
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos do screening em meio sólido.....	26
<b>Tabela 7.</b> Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) em meio sólido. Microrganismos purificados enumerados com respectivos códigos e origem.....	28
<b>Tabela 8.</b> Valores de pH e atividade enzimática (UI) para o meio sintético pobre.....	34
<b>Tabela 9.</b> Valores de pH e atividade enzimática (UI) para o meio sintético enriquecido.....	41
<b>Tabela 10.</b> Matriz do primeiro delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD <sub>5</sub> .....	42
<b>Tabela 11.</b> Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a $p < 0,05$ .....	42
<b>Tabela 12.</b> ANOVA considerando os coeficientes de regressão com $p < 0,05$ .....	43
<b>Tabela 13.</b> Matriz do segundo delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD <sub>5</sub> .....	45
<b>Tabela 14.</b> Matriz do terceiro delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD <sub>5</sub> .....	46
<b>Tabela 15.</b> Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a $p < 0,05$ .....	47
<b>Tabela 16.</b> ANOVA considerando os coeficientes de regressão com $p < 0,05$ .....	47
<b>Tabela 17.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 52°C.....	49
<b>Tabela 18.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 57°C.....	50
<b>Tabela 19.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 60°C.....	50
<b>Tabela 20.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 65°C.....	50
<b>Tabela 21.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 70°C.....	51
<b>Tabela 22.</b> Valores obtidos de $K_d$ , $t_{1/2}$ , $\Delta G$ , $\Delta H$ e $\Delta S$ para xilanase produzida pelo AAD <sub>5</sub> a diferentes temperaturas.....	52
<b>Tabela 23.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função da incubação no pH 4,0.....	53
<b>Tabela 24.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função da incubação no pH 4,5.....	53
<b>Tabela 25.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função da incubação no pH 5,3.....	53
<b>Tabela 26.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função da incubação no pH 5,7.....	53

<b>Tabela 27.</b> Atividade enzimática da cepa AAD <sub>5</sub> em função da incubação no pH 6,0.....	54
<b>Tabela 28.</b> Valores obtidos de $K_d$ e $t_{1/2}$ para diferentes pH de incubação da enzima produzida pela cepa AAD <sub>5</sub> .....	54
<b>Tabela 29.</b> Valores de atividade enzimática em função da concentração de xilana para o microrganismo AAD <sub>5</sub> .....	55
<b>Tabela 30.</b> Valores estimados de $K_m$ e $v_{max}$ estimados por meio do programa Statistica. ...	57
<b>Tabela 31.</b> Matriz do delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AY <sub>10</sub> .....	59
<b>Tabela 32.</b> Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a $p<0,05$ . ....	59
<b>Tabela 33.</b> ANOVA considerando os coeficientes de regressão com $p<0,05$ .....	60
<b>Tabela 34.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 70°C. ....	62
<b>Tabela 35.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 72°C. ....	62
<b>Tabela 36.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 75°C. ....	62
<b>Tabela 37.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 77°C.....	63
<b>Tabela 38.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 80°C.....	63
<b>Tabela 39.</b> Atividade enzimática da cepa AY <sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 85°C.....	63
<b>Tabela 40.</b> Valores obtidos de $K_d$ , $t_{1/2}$ , $\Delta G$ , $\Delta H$ e $\Delta S$ para xilanase produzida pelo AY <sub>10</sub> a diferentes temperaturas.....	64
<b>Tabela 41.</b> Valores obtidos de $K_d$ e $t_{1/2}$ para diferentes pH de incubação da enzima produzida pela cepa AY <sub>10</sub> .....	65
<b>Tabela 42.</b> Valores de atividade enzimática em função da concentração de xilana para o microrganismo AY <sub>10</sub> . ....	67
<b>Tabela 43.</b> Valores estimados de $K_m$ e $v_{max}$ estimados por meio do programa Statistica. ...	68

## RESUMO

A endo-1,4- $\beta$ -xilanase (E.C. 3.2.1.8), comumente chamada de xilanase, possui grande aplicação em diferentes tipos de indústrias tais como a de ração animal, alimentos, têxteis, de papel, de produção de etanol a partir de biomassa, entre outras. Isso se deve ao fato de que esta enzima atua na hidrólise da xilana, o segundo mais abundante polissacarídeo encontrado na natureza, que está presente ligado a hemicelulose da parede celular de plantas. O objetivo deste trabalho foi selecionar, através do método de *screening* em placas de Petri, e avaliar a atividade enzimática de leveduras silvestres isoladas de diversas regiões do Brasil (Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado e Pantanal) quanto à produção de xilanase. Para o *screening* em placas, utilizou-se um meio de cultura no qual a única fonte de carbono era a xilana para induzir a produção da enzima. De um total de 349 microrganismos analisados, foram obtidas 84 cepas produtoras, porém somente 37 possuíam um índice de relação enzimática (diâmetro do halo descolorido / diâmetro da colônia) maior que 2,5. Em função deste resultado prosseguiu-se com a seleção dos melhores microrganismos para a produção da enzima em meio líquido. Após observações preliminares apenas 9 cepas obtiveram um crescimento satisfatório em meio líquido a 30°C e 150 rpm. Estes foram avaliados em dois meios de culturas diferentes em relação à atividade enzimática do caldo enzimático à 50°C por 5 min em *shaker*. Dentre estes, os microrganismos AAD<sub>5</sub> e AY<sub>10</sub> se destacaram por apresentarem a atividade enzimática em torno de 2  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . Posteriormente, foi realizada a caracterização das enzimas produzidas, sendo que a proveniente do microrganismo AAD<sub>5</sub> possui condições ótimas na faixa de 57,5 – 67,5 °C e pH entre 4,7 – 5,5, além de meia vida de 21,33 horas a 52°C e pH 5,3, com  $v_{max}$  de 1,77  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e  $K_m$  de 0,44 g/L. Já a enzima produzida pela cepa AY<sub>10</sub> possui condições ótimas na faixa de pH entre 4,8 – 4,1 à temperatura de 80°C, além de meia vida de 11,21 horas a 72°C e pH 5,3, com  $v_{max}$  de 5,47  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e  $K_m$  de 1,37 g/L. Estes resultados demonstram o potencial de aplicação de leveduras na produção de xilanase, porém, para as cepas estudadas, há a necessidade de purificação das enzimas produzidas para que estas sejam aplicadas industrialmente.

## ABSTRACT

Endo-1,4- $\beta$ -xylanase (E.C. 3.2.1.8), commonly called xylanase, has great application in different types of industries such as feed, food, textiles, paper, ethanol from biomass, among others. These enzymes act in hydrolysis of the xylan, one of the most abundant polysaccharides found in the nature, present in cell plants linked to the hemicelullose. The main goal of this work was to select, through a screening method using Petri dishes, and to evaluate the enzymatic activity of isolated wild yeasts from several brazilian regions (Atlantic Forest, Amazonian Forest, Cerrado and Pantanal) about the production of xylanase. For the screening in Petri dishes, the culture medium used has xylan as the only carbon source to induce the production of the enzyme. From 349 evaluated microorganisms, 84 could produce xylanase, although only 37 showed an enzymatic ration (diameter of the undye halo/diameter of the colony) higher than 2.5. And, after initial assays in submerged method, 9 strains showed a satisfactory growth at 30°C and 150 rpm. Among them, the microorganisms AAD<sub>5</sub> and AY<sub>10</sub> presented a higher potential, with the enzymatic activity above 2  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . The characterization of the produced enzymes was carried out and the one produced by the strain AAD<sub>5</sub> has, as optimal conditions, temperature between 57.5 – 67.5 °C and pH 4.7 – 5.5. Also, it was shown 21.33 hours of half-life at 52°C and pH 5.3, with  $v_{max}$  of 1.77  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  and  $K_m$  of 0.44 g/L. The enzyme produced by the strain AY<sub>10</sub> has, as optimal conditions, pH between 4.8 – 4.1 and temperature around 80°C. The half-life of the enzyme was 11.21 hours at 72°C and pH 5.3, with  $v_{max}$  of 5.47  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  and  $K_m$  of 1.37 g/L. These results demonstrate the potential application of the yeasts for xylanase production, although, for those enzymes, further works are necessary to establish the actual industrial and technical potentialities.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma área de, aproximadamente, 8,5 milhões km<sup>2</sup>, com várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e as áreas temperadas. Por isso, é o país de maior biodiversidade do planeta e considerado megabiodiverso – país que reúne ao menos 70% das espécies vegetais e animais do planeta –, pela Conservation International (CI). A biodiversidade pode ser qualificada pela diversidade em ecossistemas, em espécies biológicas, em endemismos e em patrimônio genético.

Neste contexto, é válido ressaltar o potencial focado neste trabalho, de isolar microrganismos produtores de insumos importantes para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, já que como agentes de interesse biotecnológico podem ser aplicados como coadjuvantes de tecnologia.

Dentre alguns processos importantes industrialmente está a hidrólise enzimática da xilana que é o polissacarídeo de maior estrutura nas células vegetais, sendo o segundo mais abundante da natureza correspondendo aproximadamente a um terço da quantidade de carbono orgânico renovável presente na Terra. Sua completa hidrólise requer atuação de diferentes enzimas como a 1,4-β-xilanase (EC 3.2.1.8), que é crucial para a despolimerização da xilana (QINNGHE *et al*, 2004).

Por isso, há grande interesse na utilização da enzima xilanase nas indústrias de papel e polpa de frutas pela sua propriedade de separação da hemicelulose e lignina durante o branqueamento. Além disso, a xilanase também tem sido utilizada para a bioconversão de lignocelulose em açúcar, etanol e outras substâncias importantes, em processos de clarificação de sucos e vinhos, na extração de óleos vegetais além de melhorar a digestibilidade e o valor nutricional da ração animal. (VIRUPAKSHI *et al*, 2005).

Atualmente muito tem se estudado sobre a produção de xilanase a partir de fungos filamentosos e bactérias, porém a produção por leveduras não é muito citada, sendo encontradas enzimas produzidas a partir de microrganismos geneticamente modificados. Mesmo sabendo-se que muitas leveduras são produtoras desta enzima naturalmente.

Assim, este projeto tem como objetivo selecionar cepas de leveduras selvagens produtoras de xilanase. E, como objetivo específico, caracterizar a enzima produzida pelas cepas selecionadas.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leveduras

As leveduras são as mais antigas fontes de proteínas unicelulares e desempenham um papel único ao longo da história. Desde o milênio passado o homem a utilizava na produção de diversos tipos de alimentos, como por exemplo, no crescimento de pães e produção de bebidas, as quais continham álcool etílico, provavelmente, o primeiro anestésico. Recentemente estas vêm sendo utilizadas na indústria para a produção de compostos químicos, combustíveis entre outros (ROSE & HARRISON, 1987).

Vivas ou não, as leveduras possuem na composição da parede celular uma fração de carboidratos (20% a 40%) compostos principalmente por  $\beta$ -glucanos e mananos, os quais têm impacto no sistema imunológico e na capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal.

Leveduras são fungos com variada distribuição no ecossistema. Diferenciam-se dos bolores por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente em relação aos bolores. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, devido à sua maior relação área/volume. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas. São células eucarióticas e heterotróficas, possuem uma parede rígida e se reproduzem sexuada ou assexuadamente. A maioria das que têm importância em alimentos se divide por gemulação ou por fissão. As células típicas de leveduras têm um diâmetro que oscila entre 5  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ , podendo ser menores em cultivos velhos. São capazes de crescer dentro de amplos intervalos de pH ácido e em concentrações de etanol de até 18%. Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55 a 60% e produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro ao vermelho, passando pelo rosa (JAY, 1992).

Uma espécie bastante estudada é a *Saccharomyces cerevisiae* que tem sido utilizada há várias décadas na alimentação e produção de álcool. Estas são capazes de se reproduzir tanto sexuada quanto assexuada em meio com a presença ou ausência de oxigênio, o que a fez não somente comercialmente viável, mas uma fonte ideal de biomassa para pesquisa de seu comportamento celular (ROSE & HARRISON, 1987).

## 2.2. Xilana

Schulze em 1891 foi quem primeiro introduziu o termo hemicelulose para as frações isoladas ou extraídas de materiais de plantas com álcalis diluídos. As frações hemicelulósicas incluem xilanas, mananas, galactanas e arabinanas. Assim, os principais monômeros presentes na maioria das hemiceluloses são: D-xilose, D-manose, D-galactose e L-arabinose.

A hemicelulose está situada entre a lignina e as fibras de celulose das plantas. Compatível com sua estrutura química e substituições de grupos laterais, a hemicelulose parece estar entremeada, entrelaçada e covalentemente ligada em vários pontos com o revestimento de lignina, enquanto fornece uma capa em torno das fibras de celulose, via pontes de hidrogênio.

No caso da xilana, as interações covalentes com a lignina e as não-covalentes com a celulose são de extrema importância para a manutenção da integridade da celulose, ajudando assim na proteção das fibras contra celulasas (BEG *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2003).

A xilana é o maior constituinte da hemicelulose, representando em torno de 30 a 35% do peso seco total de plantas, possuindo assim alto potencial para a obtenção tecnológica de diversos produtos. É um complexo polissacarídeo composto por uma cadeia de resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose mantidos por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (BEG *et al.*, 2001; POLIZELI *et al.*, 2005).

Xilana é encontrada largamente em angiospermas (15 a 30% da parede celular) e em gimnospermas (7 a 10 % da parede celular), sendo um complexo de heteropolissacarídeos altamente ramificados, variável de acordo com a espécie, e podem ser substituídas por grupos glucuronopiranosil, acetil, furuleil, *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana, arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana, entre outros. O grau de polimerização das xilanas é diversificado, podendo variar de 70 a 200 resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose, dependendo da espécie (POLIZELI *et al.*, 2005).

Em angiospermas as xilanas são altamente acetiladas. A acetilação é mais comum na posição C-3 do que na C-2 e estes grupos acetil ligados à cadeia são responsáveis pela parcial solubilidade da xilana em água. Porém, estes grupos são prontamente removidos quando o polissacarídeo é submetido a uma extração básica. Já em gimnospermas as

xilanas não são acetiladas como nas angiospermas. Estas possuem unidades de L-arabinofuranose no lugar dos grupos acetil (BEG *et al.*, 2001).

Devido a sua heterogeneidade e complexidade a completa hidrólise da xilana depende de diversas enzimas atuando de forma cooperativa.

### 2.3. Enzimas

A história da Bioquímica se mistura com a história das pesquisas enzimáticas. A catálise biológica foi descrita inicialmente no século XVIII, em estudos baseados na digestão da carne com secreções do estômago. As pesquisas continuaram e, em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar a álcool por leveduras era catalisada por “fermentos” e postulou que estes fermentos eram inseparáveis das leveduras. Porém, em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de leveduras poderiam fermentar o açúcar a álcool e que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam ativas após a sua excreção das células. Estas moléculas foram denominadas como enzimas por Frederick W. Kühne.

A partir da segunda metade do século XX, as pesquisas enzimáticas foram intensificadas. Isto levou à purificação de milhares de enzimas, elucidação da estrutura e mecanismo químico de outras e entendimento geral sobre sua atuação.

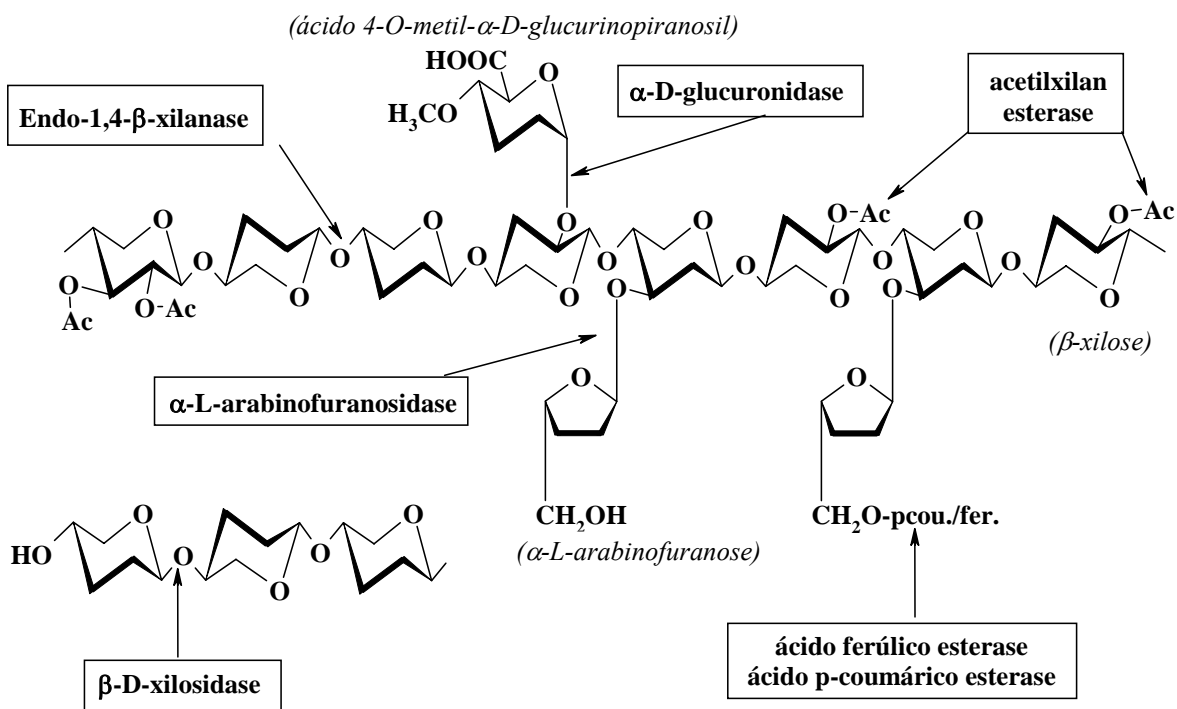
As enzimas são classificadas em seis grandes grupos: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Esta classificação é de acordo com o tipo de reação catalizada (NELSON *et al.*, 2005).

### 2.4. Xilanase

Xilanases são glicosidases (*O*-glicosidases hidrolases, EC 3.2.1.x) que catalisam a hidrólise das ligações 1,4- $\beta$ -D-xilanosílicas com xilana. Foram inicialmente denominados pentonases e então reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 quando foram codificadas como EC 3.2.1.8. A xilanase tem como nome oficial “endo-1,4- $\beta$ -xilanase”, porém ela é normalmente chamada por seus diversos sinônimos: xilanase, endoxilanase, 1,4- $\beta$ -D-xilana-xilanohidrolase, endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase,  $\beta$ -1,4-xilanase e  $\beta$ -xilanase.

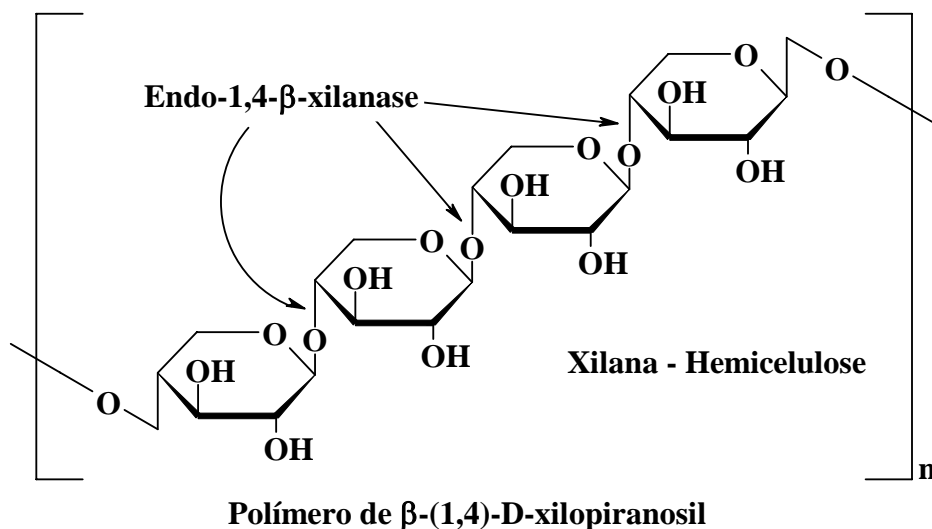
As xilanases são classificadas em duas famílias principais (F ou 10 e G ou 11) das glicosil-hidrolases. Ambas utilizam mecanismos catalíticos de par iônico e retêm a configuração anomérica durante a hidrólise. As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e produzem oligossacarídeos menores; as xilanases da família 11 são mais específicas para a xilana (MACIEL, 2006).

Como dito anteriormente, devido a sua heterogeneidade e complexidade, a completa hidrólise da xilana depende de diversas enzimas atuando de forma cooperativa. A endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase (EC 3.2.1.8) atua na cadeia de xilana em pontos diferenciados dependendo da estrutura da molécula, tamanho e presença de substituintes (Polizeli *et al*, 2005). Enquanto que a  $\beta$ -D-xilosidases atua em extremidades não redutoras na formação de monômeros de xilose. Sendo que a retirada dos substituintes é catalisada por enzimas como:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronidasases (EC 3.2.1.139), acetilxilan esterase (EC 3.2.1.72), ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) e ácido *p*-coumarico esterase (EC 3.1.1.-) (HALTRICH *et al*, 1996), o que pode ser observado na Figura 1:



**Figura 1.** Estrutura da xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas.

A Figura 2 ilustra a atuação da enzima xilanase de acordo com a sua especificidade.



**Figura 2.** Especificidade da xilanase.

Uma teoria geralmente aceita a respeito da regulação da síntese de enzimas degradadoras de substâncias poliméricas é que baixas concentrações de hidrolases são continuamente produzidas e excretadas. Com a liberação destas hidrolases ocorre a hidrólise do polissacarídeo e as pequenas partículas formadas penetram na célula induzindo-a a produzir maiores quantidades da enzima.

Por isso, a escolha do substrato ideal é de grande importância para uma produção satisfatória de xilanase. O substrato não serve apenas como fonte de carbono e energia, mas também como o componente necessário para a indução da produção enzimática no microrganismo, principalmente para um tempo prolongado de contato, podendo assim aumentar a produtividade dos processos fermentativos. De acordo com essa teoria, derivados de xilana são freqüentemente utilizados para induzir a síntese de xilanase de fungos e leveduras em laboratório (HALTRICH *et al*, 1996).

### **2.5. Cinética Enzimática**

O estudo da cinética enzimática é necessário para se entender como a fermentação acontece. A cinética de fermentações indica as taxas de formação de células e/ou produtos formados e seus efeitos nessas taxas.

### 2.5.1. Michaelis & Menten

O modelo cinético de Michaelis & Menten é um dos mais aceitos para explicar a influência da concentração de substrato na cinética de uma reação enzimática. Segundo Aiba (1973), a enzima  $E$  liga-se reversivelmente ao substrato  $S$ , formando um complexo enzimático  $E-S$  que se decompõe irreversivelmente em produto  $P$  e enzima livre  $E$ , como descrito na equação 2.1:



onde  $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  são as constantes da reação. Analisando a equação 2.1 temos:

$$v_{\max} = k_2 \cdot e_a \quad 2.2$$

sendo  $e_a$  é a concentração de enzima ativa e  $v_{\max}$  a velocidade máxima da reação.

Se a concentração do substrato é muito maior que a concentração total de enzima, a equação 2.3 é obtida através do cálculo de velocidade da reação.

$$\frac{dP}{dt} = v = \frac{k_{+2} \cdot E_0 \cdot S}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + S} = \frac{k_{+2} \cdot E_0 \cdot S}{K_m + S} \Rightarrow v = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad 2.3$$

Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $v_{\max}$  podem ser obtidos através dos dados experimentais por métodos de linearização como os de Lineweaver-Burk ou Eadie-Hofstee (DORAN, 2002; BLANCH & CLARK, 1997; SHULER & KARGI, 1992 e DIXON & WEBB, 1979). No entanto, a disponibilidade de programas matemáticos e estatísticos, cada vez mais presentes, possibilita a utilização de métodos de regressão não linear e resultados com erros mais baixos.

### 2.5.2. Lineweaver-Burk

Mesmo sendo o método mais empregado, sua precisão é indicada apenas para altos valores de substrato e para o cálculo de  $v_{\max}$ .

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad 2.4$$

A regressão linear obtida é do tipo:  $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{S} + b$ , onde o coeficiente angular corresponde ao termo  $\frac{K_m}{v_{\max}}$  e o coeficiente linear ao valor  $\frac{1}{v_{\max}}$ .

### 2.5.3. Eadie-Hofstee

Este tipo de linearização é mais indicado para o cálculo de  $K_m$ , pois suaviza as imprecisões a baixas concentrações de substrato, porém apresenta duas variáveis de importância no eixo x e a variável dependente v nos dois eixos:

$$v = -K_m \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max} \quad 2.5$$

A regressão linear obtida é do tipo:  $v = -a \cdot \frac{v}{S} + b$ , onde o coeficiente angular equivale a  $K_m$  e a intersecção a  $v_{\max}$ .

### 2.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade e atividade da enzima

As enzimas são macromoléculas de proteína com uma configuração complexa e sua atividade provem de sua estrutura terciária precisa e ordenada, de modo a formar sítios estéricos específicos de ligação entre o substrato e o centro catalítico. As ligações que mantêm as estruturas terciárias são fracas, tornando assim toda a estrutura susceptível à desestabilização (SANTOS, 2002).

Doran (2002) descreve um modelo simples de desativação no qual a enzima ativa  $E_a$  se transforma irreversivelmente na enzima inativa  $E_i$  ( $E_a \rightarrow E_i$ ), sendo a taxa de desativação  $r_d = k_d e_a$ . Onde  $r_d$  é a taxa volumétrica de desativação,  $e_a$  a concentração da enzima ativa e  $k_d$  a taxa constante de desativação.

Em um processo fechado, onde a desativação da enzima é afetada apenas pela sua concentração, temos:

$$\frac{-de_a}{dt} = r_d = k_d \cdot e_a \quad 2.6$$

Integrando a equação 2.6 temos:

$$e_a = e_{a0} \cdot e^{-k_d t} \quad 2.7$$

onde  $e_{a0}$  é a concentração ativa da enzima no tempo zero.

Como o indicado na equação 2.2, o valor de  $v_{max}$  para a reação enzimática depende da quantidade de enzima livre. Como  $e_a$  diminui devido à desativação,  $v_{max}$  também sofre uma redução. Esta variação pode ser estimada em função do tempo pela equação 2.8:

$$v_{max} = k_2 \cdot e_{a0} \cdot e^{-k_d \cdot t} = v_{max0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad 2.8$$

onde  $v_{max0}$  é o valor de  $v_{max}$  antes de ocorrer a desativação.

Utilizando a atividade enzimática  $v$  no lugar de  $v_{max}$  e aplicando o logaritmo natural temos:

$$\ln v = \ln v_0 - k_d \cdot t \Rightarrow -\ln\left(\frac{v}{v_0}\right) = k_d \cdot t \quad 2.9$$

A estabilidade enzimática frequentemente é reportada em termos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ). Esta é definida como o tempo no qual metade da atividade enzimática é perdida em função da desativação. Após um tempo correspondente a uma meia-vida ter transcorrido, a concentração enzimática é de  $e_a = e_{a0}/2$ . Substituindo na equação 2.7 e rearranjando os termos temos:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad 2.10$$

A velocidade das reações catalisadas pela maioria das enzimas aumenta com o acréscimo no valor da temperatura até atingir um valor ótimo, que confere maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando assim, aumento no número de colisões produtivas por unidade de tempo. Porém, a taxa de desativação enzimática é fortemente dependente da temperatura. Esta dependência é descrita pela equação de Arrhenius:

$$k_d = A \cdot e^{-E_d/RT} \quad 2.11$$

onde  $A$  é constante de Arrhenius,  $E_d$  a energia de ativação para a desativação enzimática,  $R$  a constante ideal dos gases e  $T$  a temperatura absoluta.

Os dados experimentais obtidos durante acompanhamento da estabilidade enzimática podem ser linearizados de acordo com a metodologia proposta por Arrhenius



que consiste em estabelecer graficamente a relação  $\ln(k_d)$  versus  $1/T$  a partir da equação 2.11, obtendo assim uma regressão linear dos pontos experimentais (equação 2.12). Esta regressão permite o cálculo direto do valor de  $E_{ad}$  através da inclinação da equação obtida.

$$\ln(k_d) = \left[ -\frac{E_{ad}}{R} \right] \cdot \frac{1}{T} + \ln(A) \quad 2.12$$

### 2.5.5. Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima

A enzima, como toda a proteína, é composta de vários aminoácidos que possuem grupos laterais básicos, ácidos e neutros. Portanto, a enzima pode conter grupos carregados positivamente ou negativamente, dependendo do valor de pH. Tais grupos ionizáveis são freqüentemente partes do sítio ativo já que o mecanismo catalítico ácido-base está ligado a várias enzimas. Desta forma, para que a catálise ocorra, os grupos ionizáveis no sítio ativo devem possuir uma carga particular, o que implica que a enzima cataliticamente ativa só existe em um estado particular de ionização. Assim, a enzima cataliticamente ativa pode ser uma fração maior ou menor da concentração total da enzima em um determinado pH (SANTOS, 2002).

De um modo similar à influência que a temperatura exerce na atividade enzimática, a enzima também apresenta um determinado valor de pH onde a atividade é máxima (pH ótimo).

### 2.5.6. Termodinâmica de desnaturação enzimática

De acordo com Cornish-Bowden & Cárdenas (2004), organismos vivos são sistemas químicos distantes do equilíbrio termodinâmico e basear-se apenas nos conceitos termodinâmicos para entendê-los nem sempre é aconselhável. A compreensão dos valores da energia livre ou da entalpia, por exemplo, pode ter muito a dizer sobre um processo, assim como as constantes cinéticas que são mais comumente analisadas.

#### 2.5.6.1. Energia Livre de Gibbs

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda está preservada ou ativa.

A desnaturação só ocorre quando  $\Delta G$  assume valor negativo, indicando que o estado atual apresenta menos energia disponível, devido à desnaturação, quando comparado com o estado inicial (MODELL & REID, 1983; DORAN, 2002).

Com base na teoria da transição de estado, que desconsidera o mecanismo de interação entre as moléculas envolvidas numa cinética enzimática, a colisão entre essas moléculas fornece energia suficiente para romper uma barreira. Essa barreira trata-se da energia de ativação para que a reação ocorra e pode ser determinada através dos valores experimentais das taxas de reação obtidas a diferentes temperaturas. De acordo com Blanch & Clark (1997) a constante  $k$  é proporcional à concentração das espécies em estado de transição, de acordo com a equação clássica para essa teoria:

$$k = \left( \frac{k_B \cdot T}{h} \right) \cdot K^\ddagger \quad 2.13$$

sendo as constantes  $k_B$  de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $h$  de Planck ( $11,04 \cdot 10^{-36} \text{ J.min}$ ) e  $K^\ddagger$  a constante de equilíbrio.

Buscando na termodinâmica a definição de energia livre de Gibbs padrão temos:

$$\Delta G^\ddagger = -R \cdot T \cdot \ln \left[ K^\ddagger (C^0)^{-1} \right] \quad 2.14$$

sendo  $R$  a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) e fazendo  $C^0$ , a concentração de estado padrão, igual a 1 e, definindo  $k$  como a constante de desnaturação da enzima  $k_d$ , a equação 2.13 em combinação com a equação 2.14 resulta na equação 2.15:

$$k_d = \left( \frac{k_B \cdot T}{h} \right) \cdot e^{\left( -\Delta G^\ddagger / R \cdot T \right)} \Rightarrow \Delta G = -R \cdot T \ln \left( \frac{k_d \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad 2.15$$

A variação de  $\Delta G$  de um estado para outro prediz a taxa de reação, pois, com o aumento da concentração de substrato ligado aos sítios ativos da enzima há uma diminuição da energia livre do sistema, ou ainda, com a desnaturação da enzima há redução da disponibilidade de sítios reativos. Diz-se, portanto, que a energia livre de Gibbs é composta pela energia de ligação e a energia de ativação (BLANCH & CLARK, 1997; DIXON & WEBB, 1979).

### 2.5.6.2. Entalpia

Entalpia ( $\Delta H$ ) é uma forma de energia chamada de função de estado por depender basicamente do estado em que a variável se encontra e não do caminho percorrido até o estado atual. Por esse motivo, a variação da entalpia de um processo é medida hipoteticamente tomando etapas da reação. Quando a etapa final absorve muito mais energia do que o estado inicial, o valor de  $\Delta H$  será positivo – o que normalmente acontece em processos de desnaturação enzimática (DORAN, 2002 ; MODELL & REID, 1983).

Dos conceitos de termodinâmica, obtemos a relação entre a energia livre de Gibbs, entalpia e entropia, conforme equação 2.16:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S \cdot T \quad 2.16$$

Substituindo a equação 2.16 na equação 2.15 temos:

$$k_d = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{-\Delta H + \Delta S \cdot T}{R \cdot T}} = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{-\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R}} \quad 2.17$$

Para a resolução desta equação deve-se assumir que  $\Delta S$  não varia com a temperatura, conforme demonstrado por Dixon & Webb (1979):

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H}{R \cdot T^2} = \frac{\Delta H + R \cdot T}{R \cdot T^2} \quad 2.18$$

Esta equação pode ser comparada com a equação empírica de Arrhenius (equação 2.11):

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{E_{ad}}{R \cdot T^2} \quad 2.19$$

Juntando as equações 2.18 e 2.19 obtemos a equação final para cálculo da entalpia através da energia de ativação da desnaturação:

$$\frac{E_{ad}}{R \cdot T^2} = \frac{\Delta H + R \cdot T}{R \cdot T^2} \Rightarrow \Delta H = E_{ad} - R \cdot T \quad 2.20$$

### 2.5.6.3. Entropia

A entropia ( $\Delta S$ ) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de números consideráveis de ligações fracas como pontes de hidrogênio. Os grupos polares vão perdendo a capacidade de ordenar as moléculas de água e a liberdade dos grupos

apolares expostos pelo desdobramento da proteína aumenta o sentido de desordem. (DORAN, 2002; MODELL & REID, 1983).

Voltando à equação 2.16, podemos obter a relação do cálculo da entropia através dos valores de entalpia e energia livre de Gibbs:

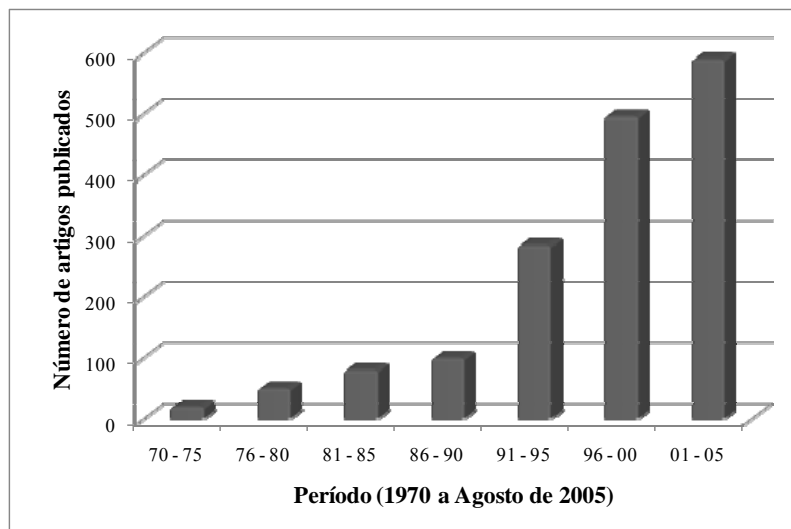
$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad \mathbf{2.21}$$

### ***2.6. Planejamento experimental***

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et al*, 1978).

Embora esta metodologia tenha sido proposta por Box na década de 50, somente nos últimos anos ela tem sido mais intensamente utilizada. Uma revisão de literatura, na base de dados do *Food Science and Technology Abstracts* (FSTA) mostrou que nos últimos anos, houve um aumento crescente e exponencial do número de artigos que utilizaram análise de superfícies de respostas e, conseqüentemente, planejamentos fatoriais (RODRIGUES & IEMMA, 2005).



**Figura 3.** Número de artigos publicados, a cada quinquênio, que utilizaram planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta (Base de dados Food Science and Technology Abstracts – FSTA).

Dentre as vantagens do planejamento experimental, encontram-se: 1) Os fatores são analisados simultaneamente. Assim, podemos verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; 2) É possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo. Podemos maximizar variáveis como rendimento, produtividade e pureza, e/ou minimizar as variáveis custo e contaminação, entre outras, individual ou simultaneamente.

### **2.6.1. Experimentos Fatoriais**

Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores (variáveis independentes ou preditoras). Na literatura especializada, os esquemas fatoriais não são considerados delineamentos experimentais, mas sim delineamentos de tratamentos. Nesse contexto, cada combinação é um tratamento.

Se todas as combinações possíveis, entre todos os níveis de cada fator, estão presentes, o esquema fatorial é dito completo. Em outros casos temos um esquema fatorial incompleto.

Assim, por exemplo, num delineamento inteiramente ao acaso com dois fatores, cada qual com dois níveis, digamos fator A = temperatura, com níveis “1” e “2”, e fator B = pH, com níveis “1” e “2”, temos as seguintes combinações, tratamentos ou ensaios:

$$\begin{array}{cc} A_1 B_1 & A_1 B_2 \\ A_2 B_1 & A_2 B_2 \end{array}$$

Denota-se por  $N^K$  um esquema fatorial completo com  $K$  fatores em estudo, cada qual com  $N$  níveis (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

### 2.6.2. Delineamento Composto Central (DCC)

O planejamento composto central deve ser utilizado quando se deseja verificar a curvatura de um plano, ou seja, quando se deseja verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

#### 2.6.2.1. Adição de pontos centrais

Para tornar possível a execução, ao menos aproximada, de inferência estatística, é usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental. Com tal procedimento estaremos viabilizando o cálculo dos resíduos e, conseqüentemente, de erro padrão e então das estimativas por intervalo, dos testes e assim por diante.

A realização de no mínimo três ensaios na condição de ponto central permite a estimação do erro puro, sendo possível avaliar a repetibilidade do processo que, do ponto de vista prático, auxilia verificar se o processo em estudo está sob controle. Além disso, realizar alguns ensaios no ponto central possibilita verificar a existência ou não de curvatura nesta região.

#### 2.6.2.2. Adição de pontos axiais

Muitas vezes temos interesse em ajustar às respostas experimentais um modelo de segunda ordem. No caso de um fatorial  $2^2 = 4$  tal modelo tem a seguinte forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 \quad 2.22$$

onde:

$x_1$  e  $x_2$  são as variáveis codificadas;

$\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  são os parâmetros do modelo de regressão.

No entanto, no modelo a ser ajustado nesse exemplo, tem-se 4 pontos fatoriais mais um ponto gerado pela média dos pontos centrais, caracterizando 5 observações independentes, naturalmente insuficiente para estimar 6 parâmetros.

Em tais situações, uma alternativa interessante consiste em adicionar ao fatorial  $2^k$  pontos axiais gerando um delineamento extremamente útil, denominado Delineamento Composto Central. Há várias possibilidades para a escolha dos níveis nos pontos axiais, uma delas é a utilização de pontos do tipo  $\pm\alpha$ , onde  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ . Alguns valores de  $\alpha$  estão descritos na Tabela 1.

Um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais assim definidos é dito Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). De modo geral, num DCCR com 2 níveis originais, temos  $2^k$  pontos fatoriais +  $2 \times k$  pontos axiais + um número arbitrário de pontos centrais.

**Tabela 1.** Valores de  $\alpha$  em função de  $k$ .

$K$	2	3	4	5	6
$\alpha$	$\pm 1,4142$	$\pm 1,6818$	$\pm 2,0000$	$\pm 2,3784$	$\pm 2,8284$

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi observar a produção de xilanase por leveduras silvestres. Para isso, realizaram-se as seguintes etapas:

1 – Triagem das leveduras selvagens produtoras de xilanase através de um método de “screening” em placas de Petri;

2 – Indução à produção da enzima em meio líquido pelos microrganismos selecionados e seleção das cepas mais produtoras;

3 – Caracterização da enzima dos microrganismos mais produtores.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) situado na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) / UNICAMP.

### 4.1. *Microrganismos utilizados*

Foram utilizadas 349 leveduras selvagens isoladas por Hernalsteens (2004) de amostras do solo, caules, frutos (em perfeito estado de maturação) e, principalmente, de flores colhidas de diversas regiões brasileiras, de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2.** Regiões na qual foram isolados os microrganismos.

Mata Atlântica (SP)	Vegetação litorânea (município de Bertioga) Vegetação da Serra do Mar (município de São Sebastião)
Cerrado (GO)	Vegetação da “Chapada dos Veadeiros”
Pantanal (MS)	Vegetação ciliar e de várzeas
Floresta Amazônica (AM)	Vegetação de matas parcialmente influenciadas pelo homem (regiões circunvizinhas de Manaus)

Todas as culturas estão armazenadas no banco de culturas do LEB – FEA/UNICAMP.

### 4.2. *Método de screening em meio sólido*

O método utilizado consiste no crescimento dos microrganismos em substrato seletivo para que as leveduras silvestres produtoras de xilanase fossem selecionadas.

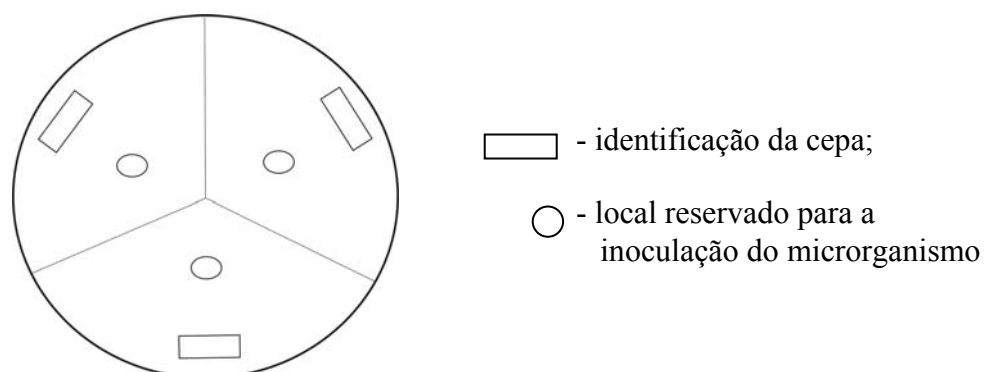
#### 4.2.1. *Meio de cultura*

As cepas de leveduras produtoras de xilanase foram selecionadas devido à capacidade de degradação da xilana solúvel como única fonte de carbono. O meio seletivo

era composto por: xilana de *birchwood* (Sigma), 10,0 g/L; extrato de levedura, 0,6 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g/L e agar, 15g/L. O pH foi ajustado para 5,0 com HCl.

Após corrigir o valor do pH, o meio de cultura foi pré-aquecido em forno de microondas (Brastemp Clean 28 L, Manaus, Amazonas, Brasil), para solubilização do agar, e esterilizado em autoclave vertical (Phoenix AV Plus, Araraquara, São Paulo, Brasil) a 121°C por 15 minutos. Depois de esterilizado, o meio ainda liquefeito foi vertido em placas de Petri no interior da câmara de fluxo laminar (Veco UFFS-12, Campinas, São Paulo, Brasil) esterilizada. Após solidificação do meio as placas foram divididas em três quadrantes, conforme a Figura 4, nas quais as diferentes cepas de leveduras presentes no banco de cultura foram inoculadas.

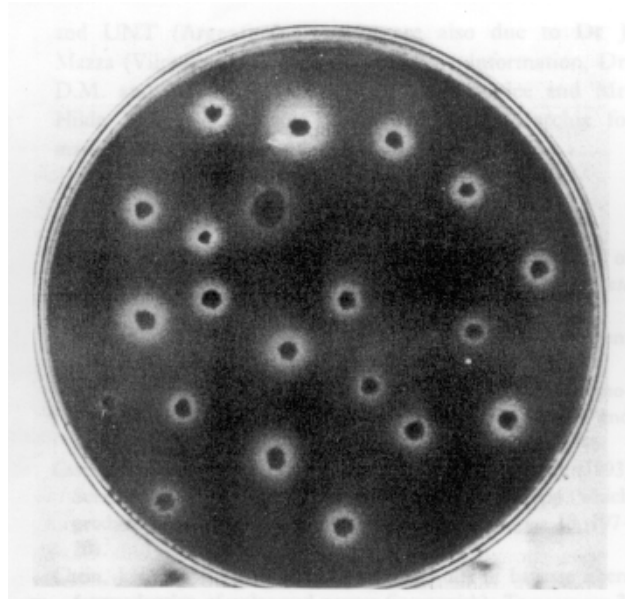
A inoculação se deu no local reservado utilizando alça de repicagem com ponta na forma de agulha. Os microrganismos foram incubados a 30°C por 96 horas.



**Figura 4.** Representação da placa de Petri dividida em 3 quadrantes.

#### **4.2.2. Seleção dos microrganismos produtores de xilanase**

Após o crescimento dos microrganismos, as placas de Petri foram coloridas com solução de vermelho do congo 1,4 g/L em tampão TRIS HCl 0,1 M com pH 8,0 por 30 minutos e, logo depois, a solução foi descartada. Posteriormente realizou-se uma lavagem com solução NaCl 0,5M por mais 30 minutos. Em torno da colônia crescida, formou-se um halo descolorido devido à ausência da xilana original, como exemplificado na Figura 5.



**Figura 5.** Técnica de screening para microrganismos produtores de xilanase. Os halos transparentes indicam a hidrólise da xilanase devido à atividade xilanolítica (Breccia *et al.*, 1995).

Os microrganismos foram selecionados de acordo com a metodologia descrita por Agnostakis *et al.* (1975) onde a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como índice enzimático de atividade (IEA), é determinado pela equação 4.1. As medidas do diâmetro do halo produzido e da colônia crescida foram feitas com paquímetro em três dimensões distintas.

$$IEA = \frac{\text{diâmetro do halo descolorido (cm)}}{\text{diâmetro da colônia (cm)}} \quad 4.1$$

#### **4.3. Purificação dos microrganismos pré-selecionados**

A purificação dos microrganismos foi realizada a partir do procedimento adotado por Hernalsteens (2004) que se baseou em Castro (1995).

O meio utilizado para a purificação foi o BDA (Batata Dextrose Agar). Para a inibição das bactérias foram adicionados 50 ppm de ácido nalidíxico e ampicilina após a esterilização e resfriamento do meio a 50°C.

Realizou-se o esgotamento das colônias nas placas de Petri como mostrado na Figura 6 e, posteriormente, estas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Este procedimento foi realizado três vezes para cada microrganismo.



**Figura 6.** Placa de Petri com a técnica de esgotamento para isolamento de leveduras.

As colônias assim isoladas foram repicadas em agar inclinado GYMP (2,0% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2,0% agar – pH 5,5), incubados a 30°C, até desenvolvimento das colônias, para posteriormente serem mantidas a 5°C (culturas estoque).

#### ***4.4. Método de screening em meio líquido agitado***

Os microrganismos purificados foram testados quanto à produção da enzima xilanase em dois meios distintos.

##### ***4.4.1. Meio sintético pobre***

Para este teste, foi elaborado o meio de cultura contendo xilana de *birchwood*, 10 g/L; extrato de levedura, 0,6 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g/L. O pH foi ajustado para 6,0 com HCl. O meio de cultura foi separado em duas frações: 10 mL colocados em tubos de ensaio e 90 mL em erlenmeyeres haletados. Todo o material foi autoclavado a 121°C por 15 min.

Para o preparo do inóculo retirou-se uma alçada direta da cultura estoque e inoculou em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio, que foi colocado em estufa a 30°C por 48 horas.

Posteriormente, o inóculo foi vertido no erlenmeyer contendo o meio de cultura autoclavado, e submetido a agitação de 150 rpm em agitadores termostáticos sob temperatura de 30°C por 48 horas.

O processo fermentativo foi acompanhado retirando-se amostras em intervalos de 12 horas e analisando-os quanto à produção enzimática, pH e massa celular.

Ao fim da fermentação, o meio de cultura foi submetido à centrifugação com 6000 rpm e temperatura de 5 °C por 15 minutos. O sobrenadante em que se encontrava a enzima produzida extracelularmente foi separado em frasco de cor âmbar, devidamente identificado com o código referente à cepa do microrganismo, e estocado sob congelamento em freezer (-18 °C) para posterior verificação da atividade enzimática.

#### **4.4.2. Meio sintético enriquecido**

Neste caso, o meio de cultura pobre foi enriquecido com peptona 5 g/L e acrescido extrato de levedura até a concentração de 3 g/L.

Todos os procedimentos foram realizados como na fermentação em meio pobre.

### **4.5. Métodos Analíticos**

#### **4.5.1. Estimativa da atividade da enzima xilanase**

A atividade da xilanase foi estimada por meio da produção de açúcares redutores de acordo com o método descrito por Qinnghé *et al* (2004) e Miller (1959). O material armazenado foi descongelado à temperatura ambiente para realização da análise.

A atividade da enzima xilanase (1,4-β-D-xilanase) foi testada segundo a metodologia descrita por Bailey *et al* (1992) onde 0,3 mL do extrato enzimático foi encubado com 2,7 mL da solução aquosa de xilana de *birchwood* 1% (p/v) dissolvida em 50 mM de tampão fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), com pH 5,3, em banho termostátizado agitado, modelo TECNAL TE-184, a 50°C por 5 minutos.

Os açúcares redutores liberados (como a D-xilose) foram testados de acordo com o método descrito por Qinnghé *et al* (2004) e Miller (1959) onde uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada em 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio. Os tubos foram submetidos a banho fervente por 5 minutos, resfriamento em banho de gelo e adição de 8 mL de solução 0,05M de tartarato de sódio e potássio (NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O). Em todas as análises foram incluídos os brancos enzimáticos.

Após este procedimento, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro modelo DU 640, fabricado por Beckman Coulter, em comprimento de onda de 540 nm. As leituras das absorbâncias foram posteriormente convertidas em atividade enzimática a partir de uma curva padrão, descrita a seguir.

Uma unidade de atividade (UI) da xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de D-xilose por minuto de reação a 50°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.5.2. Curva padrão da quantidade de açúcar redutor**

A curva padrão foi desenvolvida de acordo com a estimativa da atividade enzimática (item 4.5.1) como descrito por Bailey (1992). Todavia, ao invés de se inocular o extrato enzimático nas soluções de 1% xilana de *birchwood* (p/v) adicionaram-se diferentes concentrações de D-xilose.

### **4.6. Caracterização da enzima xilanase**

Os microrganismos que apresentaram uma produção enzimática mais eficiente foram selecionados (após as etapas acima) e as respectivas enzimas foram caracterizadas quanto aos perfis de pH e temperatura, estabilidade térmica, estabilidade em relação ao pH do meio e efeito da concentração do substrato.

#### **4.6.1. Temperatura e pH ótimos**

As variáveis pH e temperatura afetam significativamente a atuação das enzimas no meio reacional. Assim, para avaliação do efeito do pH e temperatura na atividade da enzima xilanase, foi empregado um DCCR 2<sup>2</sup>, com 3 repetições na condição central e 4 ensaios nos pontos axiais, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes empregadas foram temperatura (°C) e pH e a resposta analisada (variável dependente) foi a atividade enzimática (UI).

O planejamento descrito acima foi realizado para os microrganismos selecionados na etapa de *screening* em meio agitado, conforme item 4.4, e novos planejamentos foram realizados de acordo com a necessidade de modificação das faixas a serem analisadas. Encontram-se expressos nas Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5 os planejamentos realizados.

Os cálculos para verificar os efeitos das variáveis na atividade enzimática foram feitos por meio do software Statística versão 5.5 (STATSOFT, 2000).

**Tabela 3.** Valores utilizados em cada nível do DCCR para o microrganismo AAD<sub>5</sub> utilizando tampão Citrato 50 mM para modificação do pH.

	-1,41	-1	0	+11	+1,41
T (°C)	36	40	50	60	64
pH	3,4	3,8	4,8	5,8	6,2

**Tabela 4.** Valores utilizados em cada nível do DCCR para o microrganismo AAD<sub>5</sub> utilizando tampão Fosfato 50 mM para modificação do pH.

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
T (°C)	50	55	65	75	80
pH	6,0	6,3	7,0	7,7	8,0

**Tabela 5.** Valores utilizados em cada nível do DCCR para os microrganismos AAD<sub>5</sub> e AY<sub>10</sub> utilizando tampão citrato 50 mM para modificação do pH.

	-1,41	-1	0	+1	+1,41
T (°C)	50	55	65	75	80
pH	3,4	3,8	4,8	5,8	6,2

#### 4.6.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima xilanase foi estudada através da determinação da meia vida da enzima. A enzima foi testada incubando-a em tampão citrato 50 mM, com o melhor pH obtido, de acordo com o item 4.6.1, em diferentes temperaturas. A atividade enzimática foi determinada em intervalos de tempos pré-determinados utilizando-se o método colorimétrico DNS (MILLER, 1959). Com o resultado das atividades enzimáticas pôde-se determinar por meio das equações 2.9, 2.10, 2.12, 2.15, 2.16, 2.20 e 2.21 as constantes de desativação térmica ( $K_d$ ) para cada temperatura, a meia-vida em função da temperatura ( $t_{1/2}$ ), a energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ), a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), a entalpia ( $\Delta H$ ) e a entropia ( $\Delta S$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.6.3. Estabilidade em relação ao pH

As enzimas foram incubadas em diferentes valores de pH (3,5 – 6,0) e a atividade enzimática foi determinada em intervalos de tempos pré-determinados utilizando-se o

método colorimétrico DNS (MILLER, 1959). O estudo foi interrompido quando se verificou a perda da atividade enzimática. As análises foram realizadas em triplicata.

Com os resultados das atividades enzimáticas pôde-se determinar por meio das equações 2.9 e 2.10 a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) e a meia-vida para cada temperatura.

#### ***4.6.4. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática***

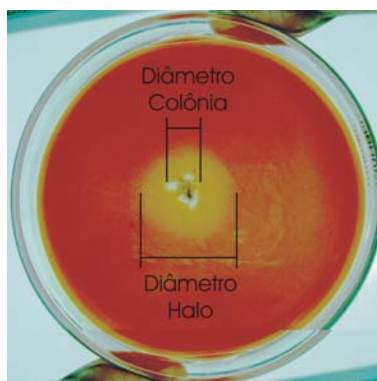
O efeito da concentração do substrato atividade da enzima foi avaliada alterando a quantidade de xilana adicionada ao meio líquido de 0,5 a 30 g/L. A atividade enzimática foi realizada conforme o item 4.5.1 e os experimentos conduzidos em triplicata. Os dados experimentais foram linearizados, conforme metodologia de Lineweaver-Burk, equação 2.4, para obtenção das constantes  $v_{max}$  e  $K_m$ . Como forma de comparação, foi utilizado o software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) para obtenção das mesmas constantes.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Screening em meio sólido

As análises das placas de Petri coloridas com a solução de vermelho congo permitiram a avaliação das diferentes cepas em relação à capacidade de produção de xilanase em meio sólido, conforme Figura 7.



**Figura 7.** Placa de Petri com o resultado obtido durante o processo de screening em meio sólido.

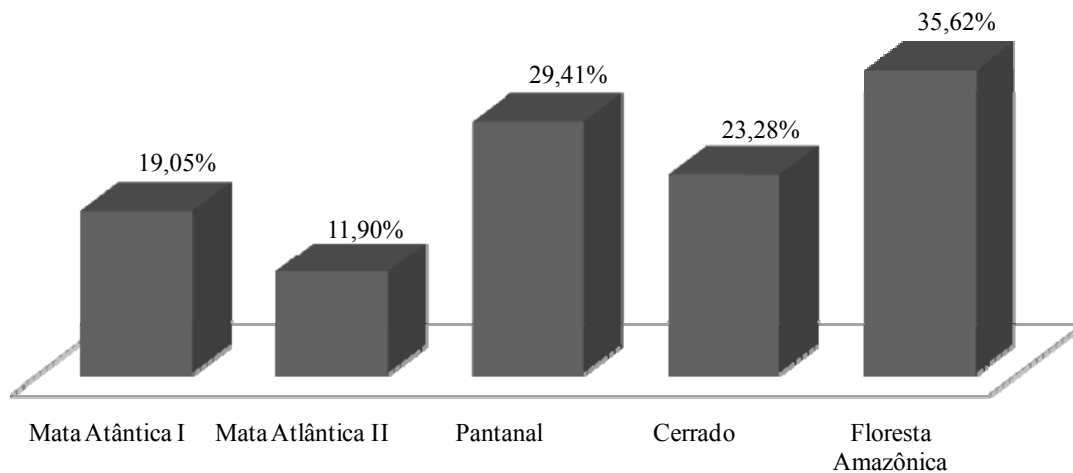
Conforme Tabela 6, das 349 leveduras silvestres avaliadas 84 possuíram atividade enzimática, ou seja, 24,07% do total analisado produziram xilanase em meio sólido. A avaliação das cepas produtoras de xilanase foi conduzida de acordo com o item 4.2.

**Tabela 6.** Resultados obtidos do screening em meio sólido.

	Microrganismos analisados	Produtores de xilanase
Mata Atlântica I	84	16
Mata Atlântica II	42	5
Pantanal	34	10
Cerrado	116	27
Floresta Amazônica	73	26
<b>Total</b>	<b>349</b>	<b>84</b>

Considerando a proporção de microrganismos analisados em cada região com relação ao número de produtores de xilanase a Floresta Amazônica possui 35,62% de

leveduras produtoras, enquanto regiões como Mata Atlântica I e II possuem, respectivamente, 19,05 e 11,90%, conforme Figura 8.

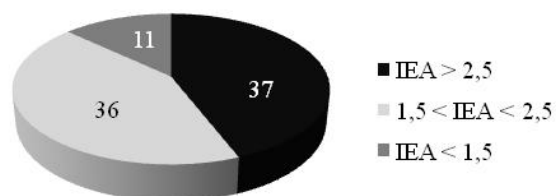


**Figura 8.** Proporção dos microrganismos produtores de xilanase em cada região.

Estes resultados, juntamente com os de Peixoto (2006), mostram a importância da Floresta Amazônica com relação à sua biodiversidade já que este autor encontrou em seu trabalho, neste mesmo banco de culturas, 9 diferentes cepas produtoras de celulases e 3 de amilases, todas oriundas da Floresta Amazônica.

Conforme descrito no item 4.2.2 o IEA foi utilizado para classificação das cepas xilanolíticas. Assim, as 84 leveduras foram classificadas como: ótimas ( $IEA \geq 2,5$ ), medianas ( $1,5 \leq IEA < 2,5$ ) e ruins ( $IEA < 1,5$ ). Na Figura 9 temos o número de cepas separadas de acordo com sua classificação.

Para a continuidade do trabalho foram utilizadas as cepas que possuíram  $IEA \geq 2,5$ , pois este indica que o diâmetro do halo produzido pela enzima é 2,5 vezes maior que o diâmetro da colônia, assegurando assim que a cepa possui uma alta capacidade de produção de xilanase ou que a enzima produzida possui alta atividade.



**Figura 9.** Quantidade de microrganismos classificados de acordo com o IEA.

## 5.2. Purificação dos microrganismos pré-selecionados

Após a seleção dos microrganismos em meio sólido, foram feitas fermentações em meios agitados conforme o item 4.4.1. No final de cada fermentação as amostras foram visualizadas em microscópio, observando-se assim a presença de contaminantes em diversas cepas. Uma análise minuciosa sobre a fonte de contaminação indicou que as cepas estavam contaminadas na origem, ou seja, no banco de culturas, provavelmente por falta de acomodação e/ou manutenção adequada. Por isso, decidiu-se fazer a purificação de todos os 37 microrganismos selecionados de acordo com o item 4.3.

Dentre as 37 cepas selecionadas, apenas 9 cresceram no meio BDA com os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico. Na Tabela 7 estão as cepas que foram re-isoladas com seus respectivos IEA do item 5.1.

**Tabela 7.** Médias dos índices de atividade enzimática (IEA) em meio sólido. Microrganismos purificados enumerados com respectivos códigos e origem.

	Região	IEA
AAD <sub>5</sub>	Cerrado	2,85
AAF <sub>4</sub>	Cerrado	6,66
AB <sub>05</sub>	Mata Atlântica 1	2,80
AF <sub>4</sub>	Floresta Amazônica	4,00
AY <sub>10</sub>	Mata Atlântica 2	3,00
AZ <sub>15</sub>	Mata Atlântica 2	3,00
J <sub>06</sub>	Pantanal	2,50
Q <sub>03</sub>	Pantanal	3,83
T <sub>05</sub>	Mata Atlântica 1	3,25

Os microrganismos purificados foram repicados em ágar inclinado GYMP, incubados a 30°C até o desenvolvimento das colônias e posteriormente, mantidos a 5°C como novas culturas estoque.

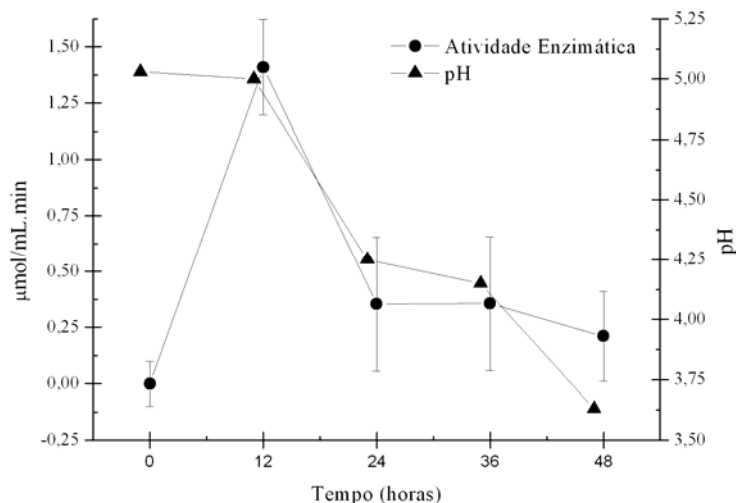
### 5.3. Screening em meio líquido agitado

Todos os microrganismos purificados foram submetidos a crescimento em diferentes meios de cultura agitados com o intuito de se escolher os melhores para a etapa de caracterização enzimática.

#### 5.3.1. Meio sintético pobre

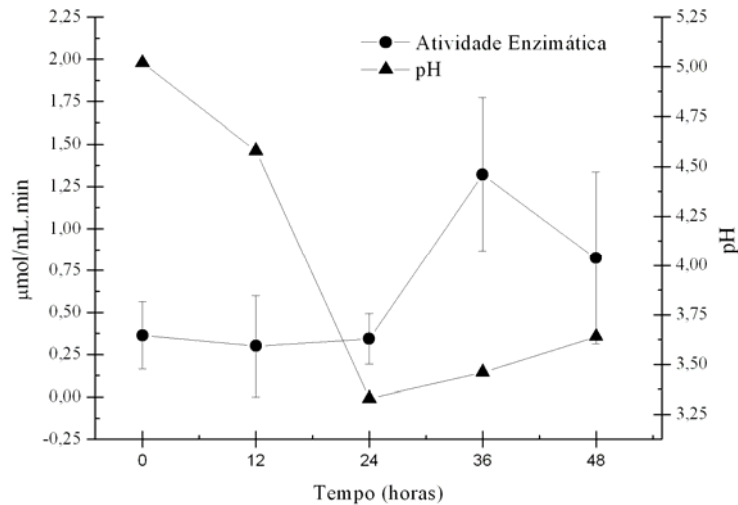
Inicialmente, as cepas foram testadas em meio líquido considerado pobre, conforme item 4.4.1.

Pode-se observar na Figura 10 que o microrganismo AAD<sub>5</sub> possuiu uma máxima atividade enzimática de 1,35  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  às 12 horas de fermentação, tendo esse valor diminuído para valores próximos de zero posteriormente. Já o pH do meio de fermentação começa a diminuir logo após a inoculação, tendo o seu valor mínimo de 3,62 após 48 horas de fermentação.



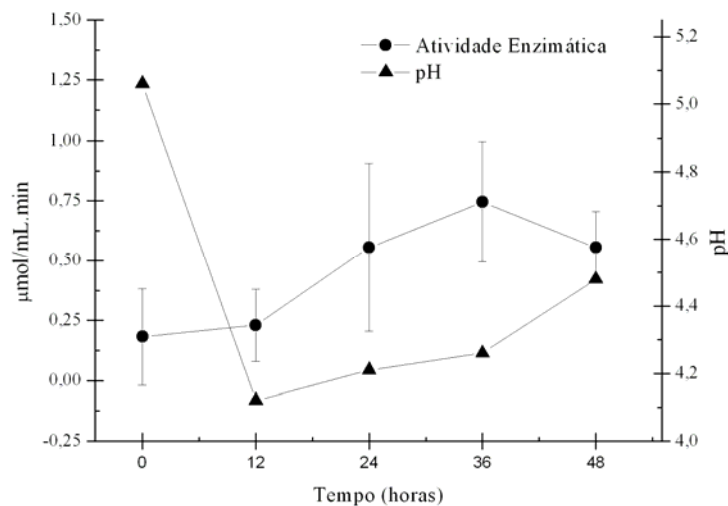
**Figura 10.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD<sub>5</sub> em meio pobre.

Já o microrganismo AAF<sub>4</sub> possuiu uma atividade enzimática máxima de 1,35  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  após 36 horas, enquanto o pH teve seu valor mínimo de 3,3 após 24 horas de fermentação como mostrado na Figura 11.



**Figura 11.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAF<sub>4</sub> em meio pobre.

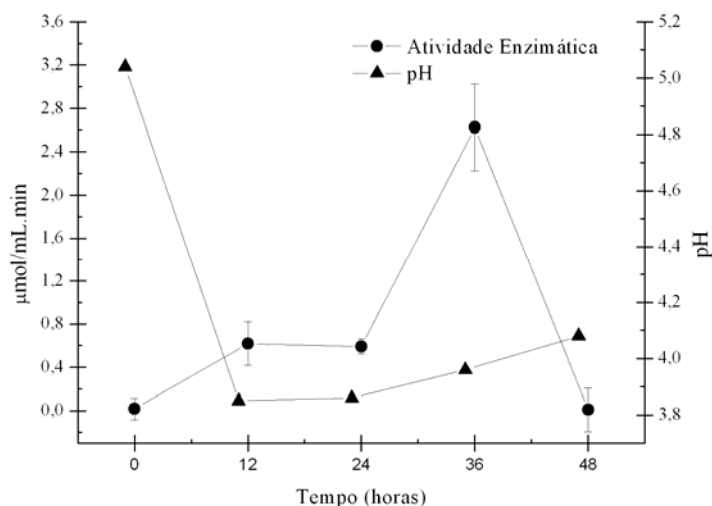
Conforme Figura 12 o microrganismo AB<sub>05</sub> possuiu atividade enzimática máxima de 0,75 μmol/mL.min após 36 horas de fermentação, enquanto o pH atingiu 4,1 depois de 12 horas, tendo seu valor aumentado ligeiramente até o final da fermentação.



**Figura 12.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AB<sub>05</sub> em meio pobre.

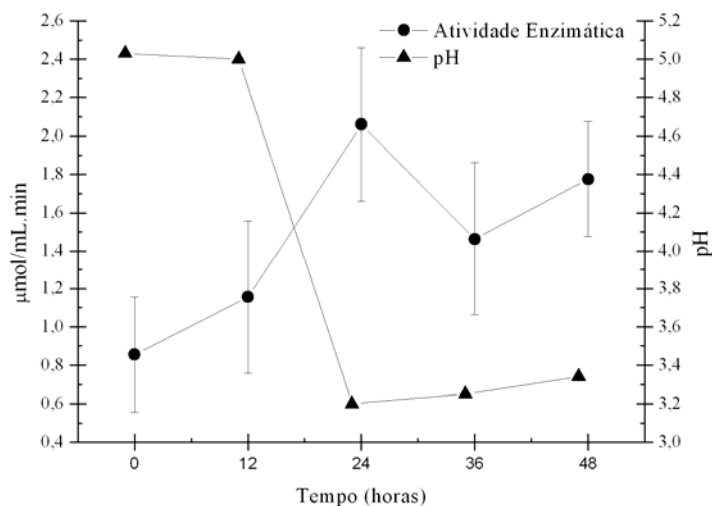
O microrganismo AF<sub>4</sub>, como mostrado na Figura 13, possuiu uma atividade enzimática máxima de 2,7 μmol/mL.min após 36 horas de fermentação, porém a queda repentina observada posteriormente indica pouca estabilidade da enzima ao pH baixo ou à

temperatura de fermentação. Já o pH obteve o valor mínimo de 3,9 após 12 horas, tendo um ligeiro aumento, terminando a fermentação no valor de 4,1.



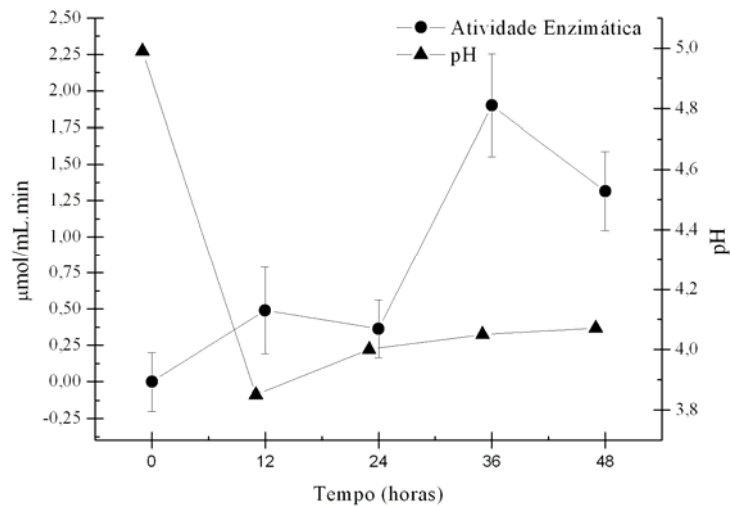
**Figura 13.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AF<sub>4</sub> em meio pobre.

Observando a Figura 14 nota-se que o microrganismo AY<sub>10</sub> obteve um valor máximo de atividade enzimática depois de 24 horas de fermentação. Porém, após este tempo o valor não diminuiu significativamente podendo ser considerado constante devido aos desvios padrões. Essa atividade enzimática em torno de 2,0 μmol/mL.min durante o restante da fermentação pode indicar certa estabilidade da enzima tanto ao pH quanto à temperatura da fermentação. Já o pH obteve seu valor mínimo de 3,2 após 24 horas.



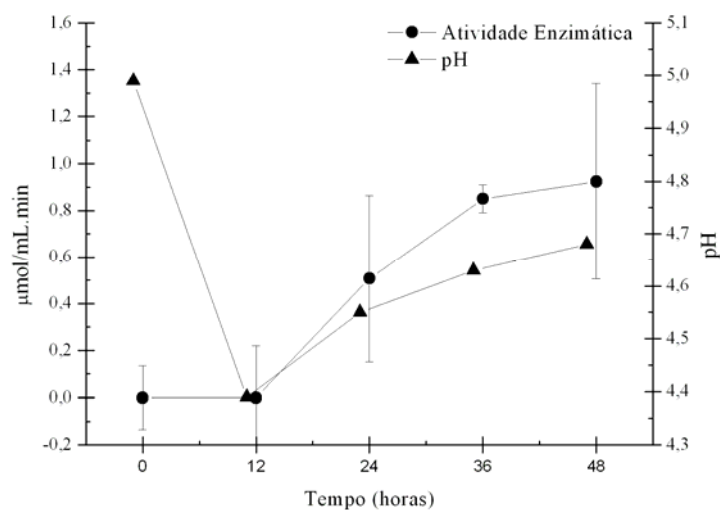
**Figura 14.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AY<sub>10</sub> em meio pobre.

No caso do microrganismo AZ<sub>15</sub>, a atividade teve seu valor máximo de 1,9  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  após 36 horas. Já o pH teve seu mínimo de 3,85 depois de 12 horas e manteve-se na faixa dos 4 até o final, como mostrado na Figura 15.



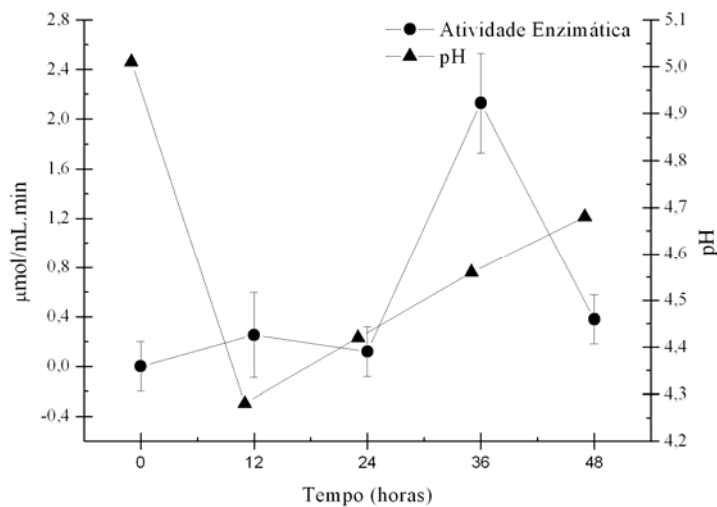
**Figura 15.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AZ<sub>15</sub> em meio pobre.

Pode-se observar na Figura 16 que o microrganismo J<sub>06</sub> obteve valores baixos de atividade enzimática durante todo o tempo analisando, tendo também seu valor de pH variado pouco, indicando assim que o comportamento do microrganismo não foi satisfatório neste meio de cultura.



**Figura 16.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo J<sub>06</sub> em meio pobre.

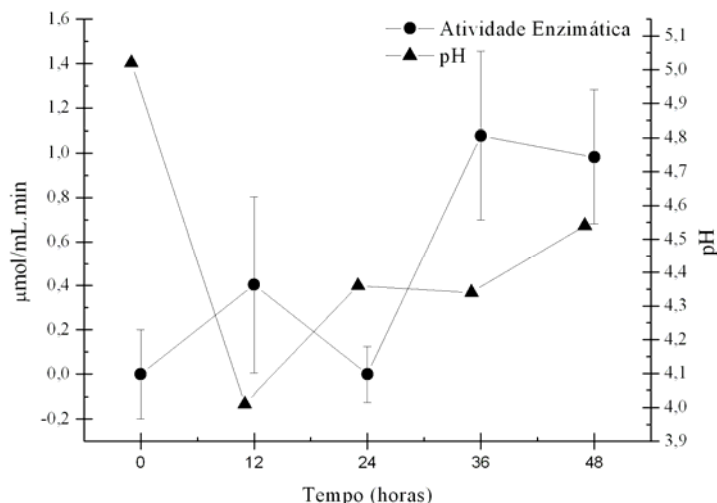
Apesar do pH do meio de fermentação do microrganismo Q<sub>03</sub> não variar significativamente, ficando em torno de 4,5, sua atividade enzimática obteve valor máximo de 2,1  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  após 36 horas, decaindo posteriormente para 0,4  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ , como pode-se observar na Figura 17. Como dito anteriormente, esta queda repentina pode indicar pouca estabilidade da enzima ao meio fermentativo.



**Figura 17.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo Q<sub>03</sub> em meio pobre.

O microrganismo T<sub>05</sub> não possuiu valores de atividade enzimática próximo ao das outras cepas, tendo seu máximo em 1,0  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  após 36 horas de fermentação e um valor mínimo de pH de 4,0 após 12 horas, conforme Figura 18.





**Figura 18.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo T<sub>05</sub> em meio pobre.

Na Tabela 8 estão os valores de atividade enzimática (UI) e pH de cada cepa estudada durante as fermentações.

**Tabela 8.** Valores de pH e atividade enzimática (UI) para o meio sintético pobre.

Cepas	Tempo de Fermentação (horas)									
	0		12		24		36		48	
	UI	pH	UI	pH	UI	pH	UI	pH	UI	pH
AAD <sub>5</sub>	0,00±0,10	5,03	1,41±0,21	5,00	0,35±0,30	4,25	0,35±0,30	4,15	0,21±0,20	3,63
AAF <sub>4</sub>	0,36±0,20	5,02	0,00±0,30	4,58	0,34±0,15	3,33	1,32±0,45	3,46	0,82±0,51	3,64
AB <sub>05</sub>	0,18±0,20	5,06	0,23±0,15	4,12	0,56±0,35	4,21	0,75±0,25	4,26	0,56±0,15	4,48
AF <sub>4</sub>	0,02±0,10	5,04	0,62±0,20	3,85	0,59±0,07	3,86	2,63±0,40	3,96	0,00±0,20	4,08
AY <sub>10</sub>	0,86±0,30	5,03	1,16±0,40	5,00	2,06±0,40	3,20	1,46±0,40	3,25	1,78±0,30	3,34
AZ <sub>15</sub>	0,00±0,20	4,99	0,49±0,30	3,85	0,36±0,20	4,00	1,90±0,35	4,05	1,32±0,27	4,07
J <sub>06</sub>	0,00±0,14	4,99	0,00±0,22	4,39	0,51±0,36	4,55	0,85±0,06	4,63	0,92±0,42	4,68
Q <sub>03</sub>	0,00±0,20	5,01	0,25±0,34	4,28	0,12±0,21	4,42	2,13±0,42	4,56	0,38±0,19	4,68
T <sub>05</sub>	0,00±0,19	5,02	0,40±0,41	4,01	0,00±0,12	4,36	1,08±0,38	4,34	0,98±0,30	4,54

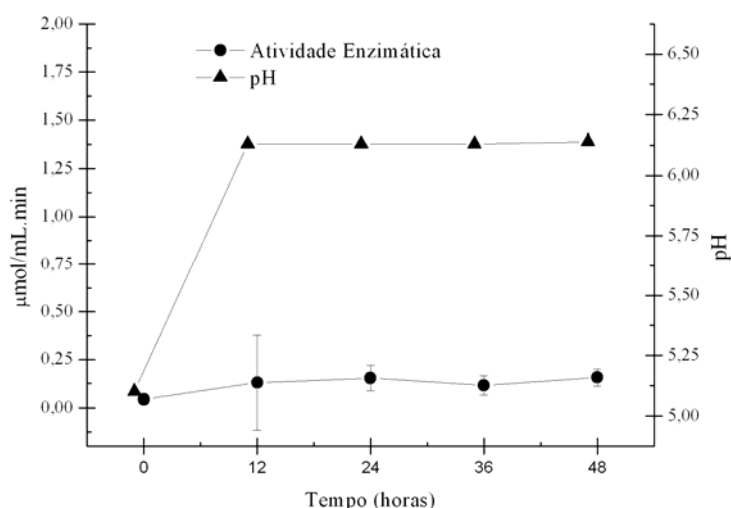
Como todos os microrganismos são silvestres, ou seja, não foram taxinômados, não foi possível buscar na literatura como estes se comportariam em meios agitados.

Todavia, notou-se que o valor de pH de todas as fermentações alcançou valores baixos, o que poderia inibir a produção enzimática, ou ainda, desestabilizar as enzimas que por ventura tenham sido produzidas. Além disso, muitas cepas não obtiveram uma produção enzimática satisfatória visto que Knob *et al* (2007) conseguiu 7,8  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  a partir de *Penicillium sclerotiorum*. Sendo assim, estudou-se a necessidade de enriquecimento do meio de cultura para uma melhor escolha dos microrganismos produtores de xilanase.

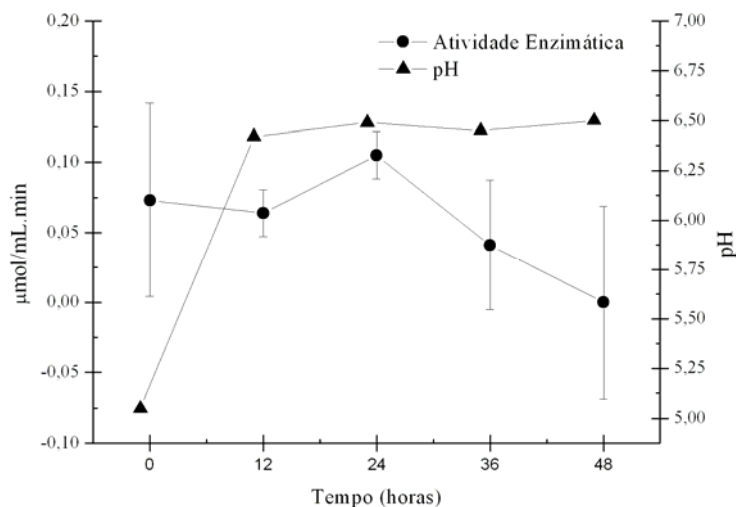
### 5.3.2. Meio sintético enriquecido

As nove cepas purificadas foram testadas de acordo com o item 4.4.2 tendo sua atividade enzimática avaliada conforme item 4.5.1.

Os microrganismos AB<sub>05</sub> e AZ<sub>15</sub> tiveram comportamento parecido durante a fermentação, conforme Figura 19 e Figura 20. Estes obtiveram uma baixa produção enzimática, abaixo de 0,25  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ . Já o pH obteve um valor de 6,1 para a cepa AB<sub>05</sub> e 6,50 para AZ<sub>15</sub> após 12 horas de fermentação, mantendo-se constante posteriormente.

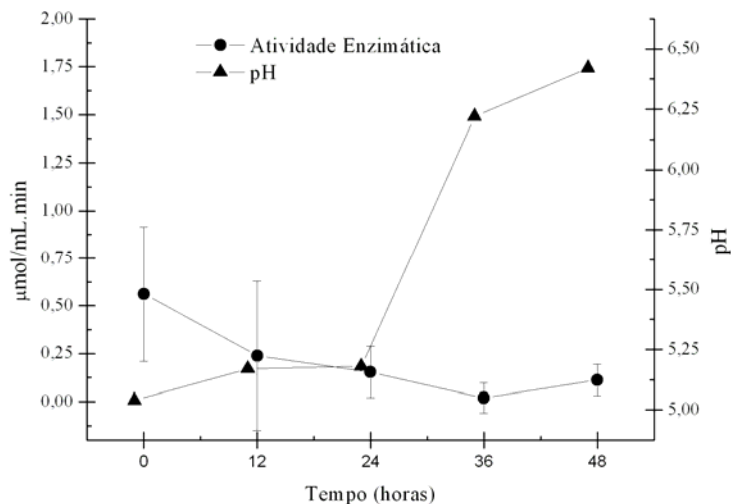


**Figura 19.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AB<sub>05</sub> em meio enriquecido.



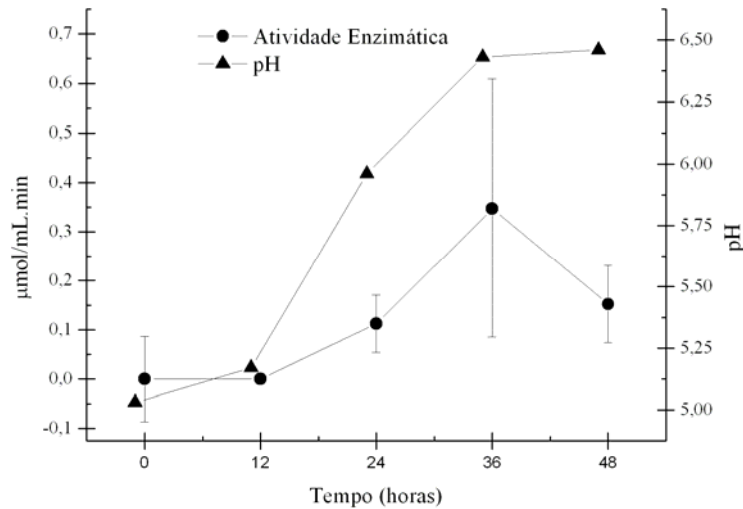
**Figura 20.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AZ<sub>15</sub> em meio enriquecido.

O microrganismo AAF<sub>4</sub> também obteve uma baixa atividade enzimática, em torno de 0,1 μmol/mL.min sendo que o pH atingiu valores acima de 6,25 após 36 horas de fermentação, conforme Figura 21.



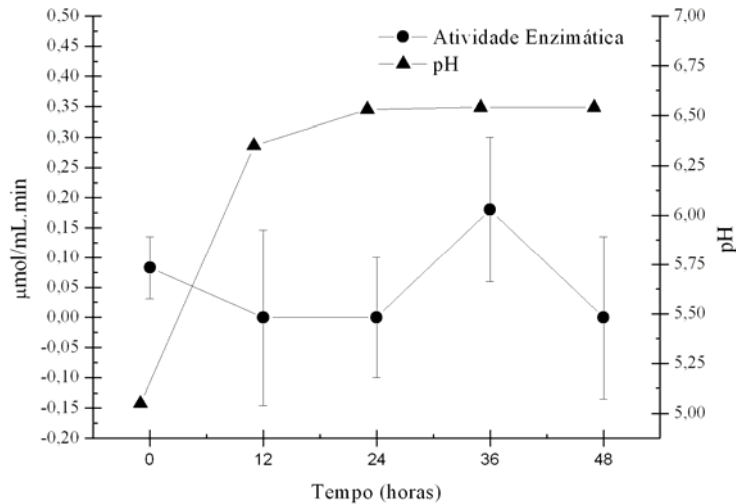
**Figura 21.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAF<sub>4</sub> em meio enriquecido.

Já a cepa AF<sub>4</sub> atingiu o valor de 0,35 μmol/mL.min após 36 horas de fermentação, mesmo tempo necessário para o pH do meio chegar a 6,5, mantendo-se constante posteriormente, conforme Figura 22.

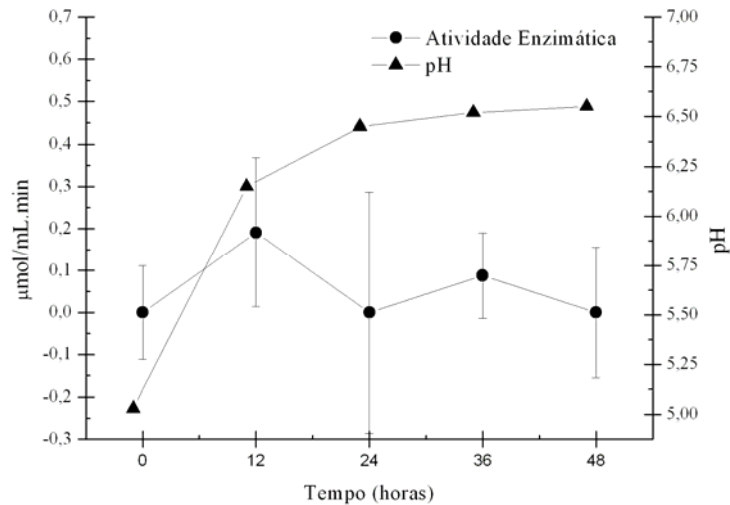


**Figura 22.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AF<sub>4</sub> em meio enriquecido.

Assim como as cepas AB<sub>05</sub> e AZ<sub>15</sub>, os microrganismos J<sub>06</sub> e T<sub>05</sub> não possuíram expressiva produção enzimática, tendo também o pH atingido valores acima de 6,25 após 12 horas de fermentação, conforme Figura 23 e Figura 24.

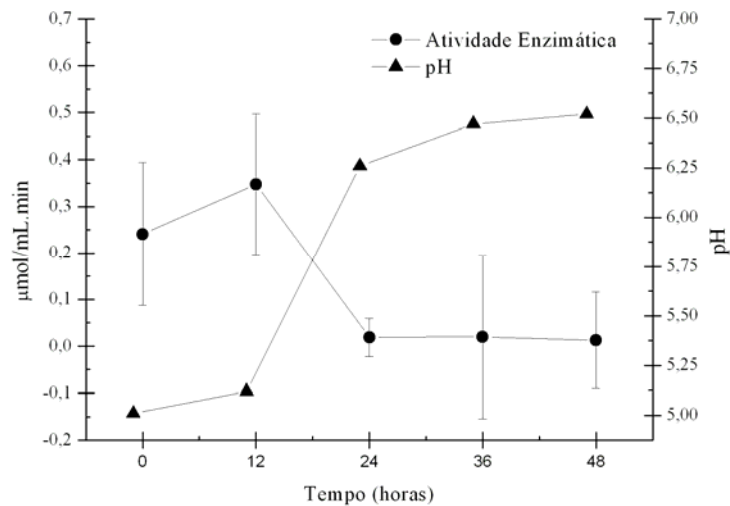


**Figura 23.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo J<sub>06</sub> em meio enriquecido.



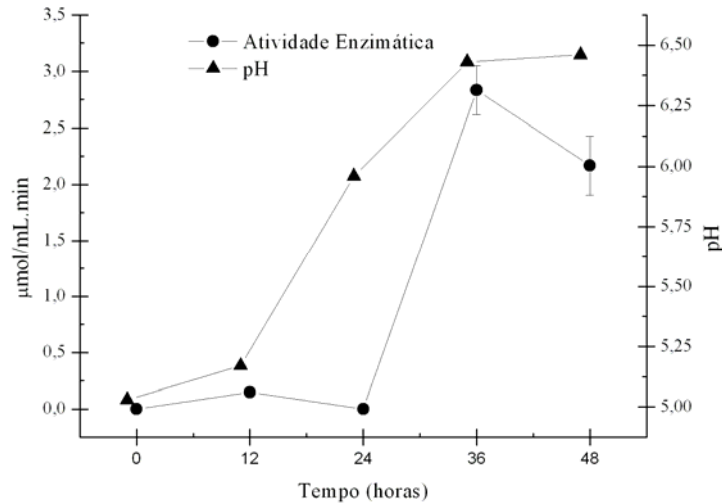
**Figura 24.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo T<sub>05</sub> em meio enriquecido.

Já o microrganismo Q<sub>03</sub> obteve valores de pH acima de 6,25 após 24 horas de fermentação, porém a atividade enzimática teve seu valor máximo de 0,35 μmol/mL.min depois de 12 horas, decaindo posteriormente.



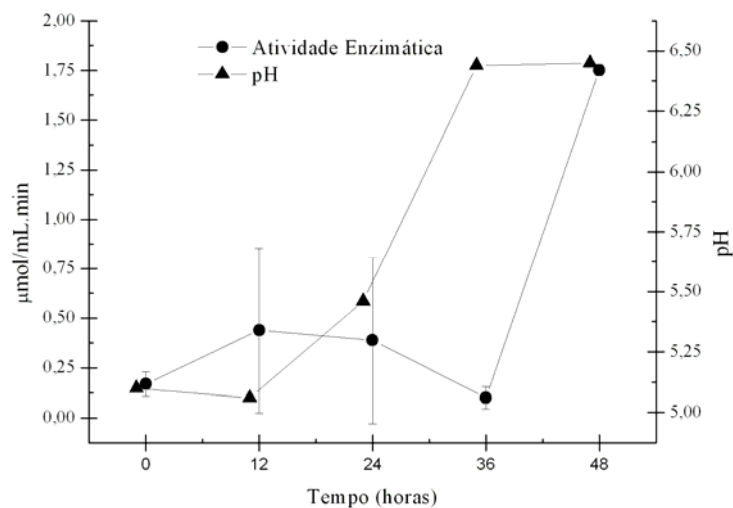
**Figura 25.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo Q<sub>03</sub> em meio enriquecido.

Diferentemente das demais cepas AY<sub>10</sub> obteve elevada atividade enzimática na fermentação em meio enriquecido, chegando a valores próximos de 3,0 μmol/mL.min após 36 horas. O pH atingiu o valor de 6,5 neste mesmo tempo.

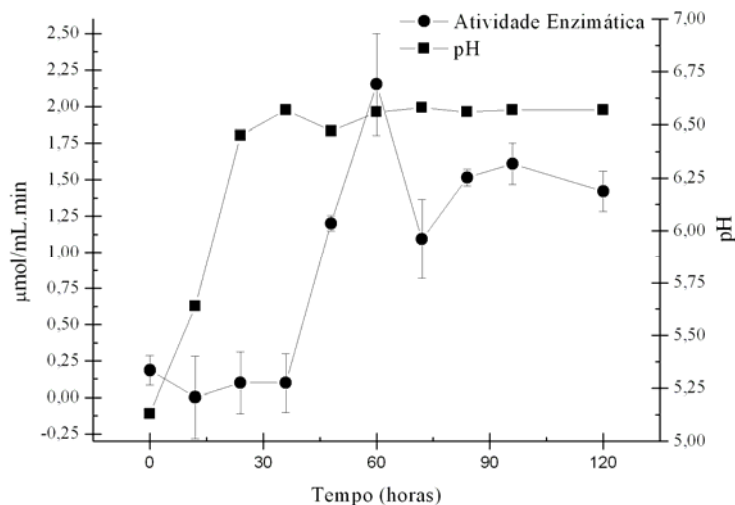


**Figura 26.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AY<sub>10</sub> em meio enriquecido.

Conforme a Figura 27, a cepa AAD<sub>5</sub> obteve uma alta atividade comparada com as demais, de 1,75 μmol/mL.min, porém esse valor foi encontrado após 48 horas de fermentação. Como existia a dúvida se este valor era máximo ou se a atividade estava aumentando gradativamente após este tempo, decidiu-se fazer uma fermentação longa, de 120 horas, com este microrganismo, conforme Figura 28.



**Figura 27.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD<sub>5</sub> em meio enriquecido.



**Figura 28.** Atividade enzimática e variação do pH durante fermentação do microrganismo AAD<sub>5</sub> em meio enriquecido.

Pode-se observar na Figura 28 que a cepa AAD<sub>5</sub> obteve a atividade máxima, de 2,20 μmol/mL.min após 60 horas de fermentação. O pH atingiu o valor de 6,60 após 24 horas e manteve-se praticamente constante até o final da fermentação.

Apesar dos valores de atividade de todos os microrganismos estarem abaixo de 3,0 μmol/mL.min, deve-se levar em consideração que não foi feita nenhuma otimização para composição dos meios de cultura, diferentemente do trabalho de Knob (2007). Ao final desta etapa foram selecionadas as cepas que teriam suas enzimas caracterizadas.

Foram escolhidas as enzimas dos microrganismos AAD<sub>5</sub> e AY<sub>10</sub>, no meio enriquecido, para caracterização. Apesar de outras cepas em meio pobre terem atividades enzimáticas semelhantes aos escolhidos, todas tinham grande variação na atividade com o decorrer do tempo, indicando pouca estabilidade da enzima.

Após seleção dos microrganismos, estes foram crescidos em meios enriquecidos agitados e seu meio fermentativo, ao final do tempo determinado de fermentação, foi centrifugado a 6000 rpm e separado em amostras de 10 mL para posteriormente ser congelado. Para a cepa AY<sub>10</sub> a fermentação foi realizada durante 36 horas. Já para AAD<sub>5</sub>, foram 60 horas de fermentação.

Na Tabela 9 estão os valores de pH e atividade enzimática (UI) de cada cepa estudada durante as fermentações.

**Tabela 9.** Valores de pH e atividade enzimática (UI) para o meio sintético enriquecido.

Cepas	Tempo de Fermentação (horas)									
	0		12		24		36		48	
	UI	pH	UI	pH	UI	pH	UI	pH	UI	pH
AAD <sub>5</sub>	0,17±0,06	5,10	0,44±0,42	5,06	0,39±0,42	5,46	0,10±0,06	6,44	1,75±0,03	6,45
AAF <sub>4</sub>	0,56±0,35	5,04	0,24±0,39	5,17	0,15±0,14	5,18	0,02±0,08	6,22	0,11±0,08	6,42
AB <sub>05</sub>	0,04±0,23	5,10	0,13±0,25	6,13	0,15±0,07	6,13	0,12±0,05	6,13	0,16±0,04	6,14
AF <sub>4</sub>	0,00±0,09	5,03	0,00±0,01	5,17	0,11±0,06	5,96	0,34±0,27	6,43	0,15±0,08	6,46
AY <sub>10</sub>	0,00±0,03	5,03	0,15±0,01	5,17	0,00±0,02	5,96	2,83±0,21	6,43	2,17±0,26	6,46
AZ <sub>15</sub>	0,07±0,06	5,05	0,06±0,02	6,42	0,11±0,02	6,49	0,04±0,04	6,45	0,00±0,06	6,50
J <sub>06</sub>	0,08±0,05	5,05	0,00±0,14	6,35	0,00±0,10	6,53	0,18±0,12	6,54	0,00±0,13	6,54
Q <sub>03</sub>	0,24±0,15	5,01	0,35±0,15	5,12	0,02±0,04	6,26	0,02±0,17	6,47	0,01±0,10	6,52
T <sub>05</sub>	0,00±0,11	5,03	0,19±0,17	6,15	0,00±0,28	6,45	0,08±0,10	6,52	0,00±0,15	6,55

#### 5.4. Caracterização da enzima xilanase produzida pela cepa AAD<sub>5</sub>

Para cada etapa da caracterização coletou-se uma amostra congelada de 10 mL e descongelou-a a temperatura ambiente. Com a enzima descongelada, procedeu-se a caracterização da mesma quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidade à temperatura e pH e efeito da concentração de substrato na velocidade enzimática.

##### 5.4.1. Determinação da temperatura e pH ótimos

Para este microrganismo foram realizados três planejamentos experimentais de acordo com a necessidade encontrada a partir dos resultados de cada um deles.

Desse modo, estão descritos a seguir os resultados obtidos e as justificativas para a realização dos planejamentos subseqüentes, e estes, para melhor compreensão, foram organizados em subtópicos.

##### 5.4.1.1. Primeiro planejamento, utilizando tampão citrato 50 mM

Os valores codificados e os reais das duas variáveis independentes (temperatura °C e pH) além das respostas (atividade enzimática UI) obtidas para cada ensaio estão expressos na Tabela 10. Para obtenção dos diversos níveis de pH utilizou-se o tampão citrato 50 mM.



**Tabela 10.** Matriz do primeiro delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD<sub>5</sub>.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade enzimática (UI)
	Temperatura (°C)	pH	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	
1	40	3,8	-1	-1	0,88
2	60	3,8	1	-1	0,66
3	40	5,8	-1	1	0,91
4	60	5,8	1	1	2,17
5	36	4,8	-1,41	0	0,74
6	64	4,8	1,41	0	2,35
7	50	3,4	0	-1,41	0,62
8	50	6,2	0	1,41	1,33
9	50	4,8	0	0	1,57
10	50	4,8	0	0	1,33
11	50	4,8	0	0	1,42

A partir dos dados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão onde, considerando somente os termos estatisticamente significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) obteve-se a Tabela 11.

**Tabela 11.** Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a  $p < 0,05$ .

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	1,47	0,09	16,10	$< 0,0001$
x <sub>1</sub> (L)	0,41	0,08	5,39	0,00168
x <sub>2</sub> (L)	0,32	0,08	4,14	0,00606
x <sub>2</sub> (Q)	-0,27	0,09	-3,05	0,02262
1L x 2L	0,37	0,11	3,43	0,01393

Com exceção da variável temperatura (Q) – x<sub>1</sub> (Q) –, todos os parâmetros foram significativos, podendo se elaborar um modelo com as variáveis codificadas:

$$\text{Atividade} = 1,467 + 0,414 \cdot T(L) + 0,318 \cdot \text{pH}(L) - 0,266 \cdot \text{pH}(Q) + 0,372 \cdot T(L) \cdot \text{pH}(L) \quad 5.1$$

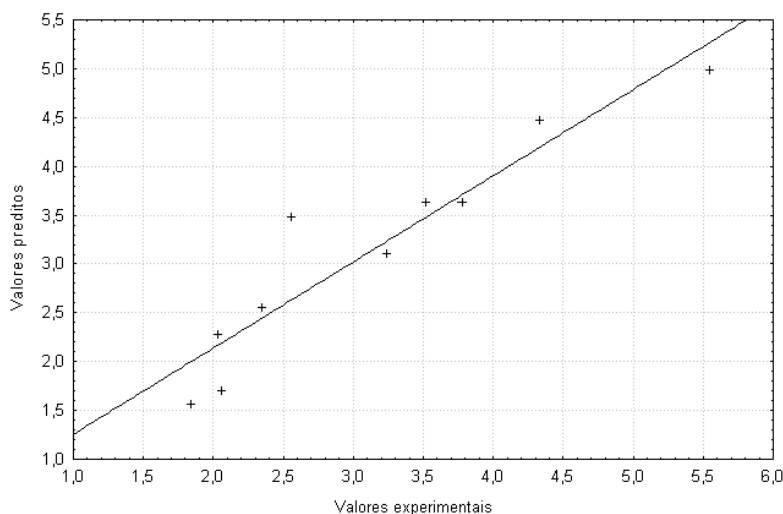
Pela ANOVA, apresentada na Tabela 12, observou-se que o modelo que descreve a resposta “atividade” em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, é adequado visto que a porcentagem de variação explicada é de 91,82% e o  $F_{\text{calculado}}$  (16,85) é maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$  (4,53), satisfazendo os requisitos para a construção da superfície e curvas de resposta (Figura 30).

**Tabela 12.** ANOVA considerando os coeficientes de regressão com  $p < 0,05$ .

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	3,17	4	0,79	16,85
Resíduos	0,28	6	0,05	-
Total	3,45	10	-	-

$F_{4;6;0,05} = 4,53$  ; variação explicada ( $R^2$ ) = 91,82%

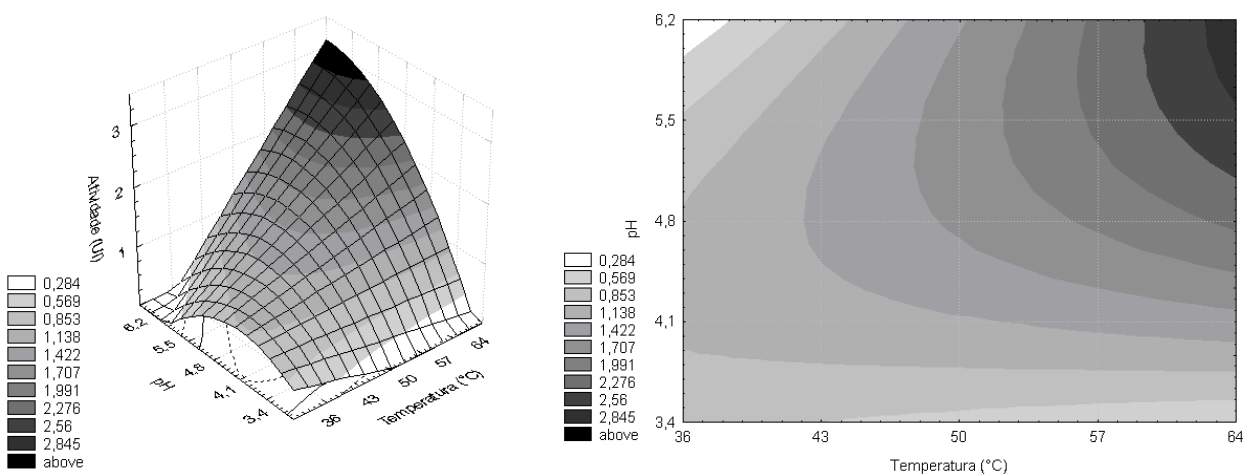
A Figura 29 apresenta os resultados experimentais *versus* os resultados previstos pelo modelo ajustado mostrando uma boa coerência entre eles.



**Figura 29.** Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado no primeiro delineamento experimental para o microrganismo AAD<sub>5</sub>.

Através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 30), pode-se observar que os maiores valores para atividade enzimática foram obtidos nos ensaios de nível +1,414, tanto para o pH quanto para a temperatura. Além disto, a Figura 30 indica que há

uma tendência crescente de resposta dos níveis mais baixos em direção aos níveis mais altos das variáveis independentes estudadas. Portanto, mostrou-se necessário realizar um novo delineamento experimental onde se modificaram as faixas estudadas e os níveis axiais positivos deste foram utilizados como centrais do próximo, apresentado a seguir.



**Figura 30.** Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD<sub>5</sub> no primeiro delineamento experimental.

#### 5.4.1.2. Segundo planejamento, utilizando tampão fosfato 50mM

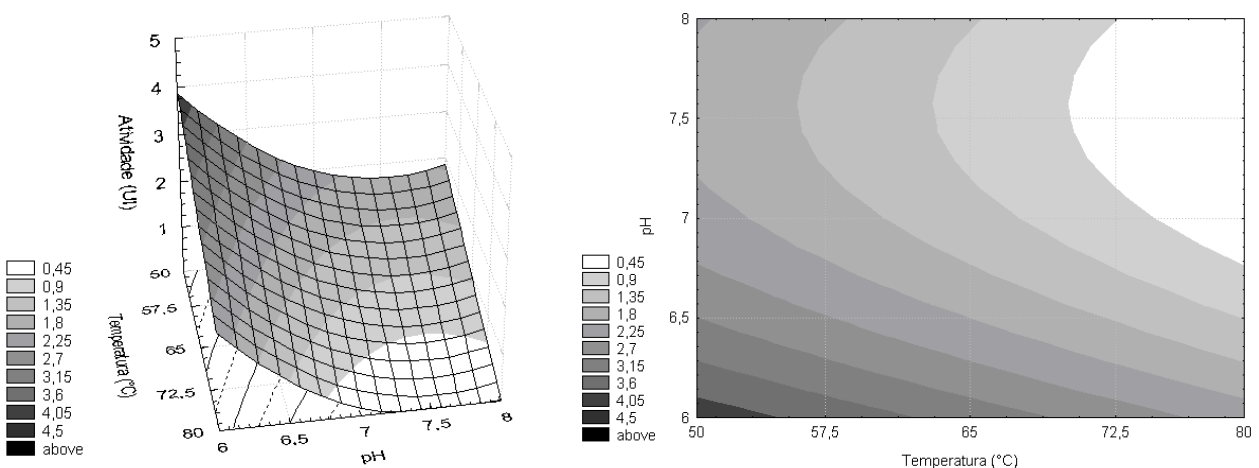
Para se obter a faixa desejada de pH, como proposto anteriormente, foi necessário utilizar o tampão fosfato 50 mM, uma vez que por meio do tampão citrato não é possível atingir tal faixa.

Estão expressos na Tabela 13 os valores codificados e os reais das duas variáveis independentes (temperatura °C e pH), assim como as respostas (atividade enzimática UI) obtidas para cada ensaio.

**Tabela 13.** Matriz do segundo delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD<sub>5</sub>.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade enzimática (UI)
	Temperatura (°C)	pH	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	
1	55	6,3	-1	-1	2,76
2	75	6,3	1	-1	0,88
3	55	7,7	-1	1	1,49
4	75	7,7	1	1	0,28
5	50	7,0	-1,41	0	1,95
6	80	7,0	1,41	0	0,51
7	65	6,0	0	-1,41	3,47
8	65	8,0	0	1,41	0,74
9	65	7,0	0	0	1,02
10	65	7,0	0	0	1,02
11	65	7,0	0	0	1,10

A partir dos dados obtidos, foram realizadas todas as etapas de análise dos dados descritas para o primeiro planejamento (item 5.4.1.1) e obteve-se um modelo significativo a partir do qual se construíram a superfície de resposta e as curvas de contorno, conforme Figura 31.



**Figura 31.** Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD<sub>5</sub> no segundo delineamento experimental.

Ao contrário do que se esperava quando modificou-se as faixas das variáveis independentes do primeiro planejamento, a superfície encontrada indicou que o aumento da temperatura e do pH acarreta numa diminuição da atividade enzimática. Este comportamento do modelo pode ser explicado pelo fato de que o tampão fosfato alterou a estabilidade da enzima, fazendo com que as respostas experimentais obtidas fossem diferentes do que se atendia.

Deste modo, optou-se por realizar um novo delineamento utilizando a faixa de pH do primeiro planejamento e a de temperatura do segundo, podendo-se, assim, obter os níveis de pH desejados por meio do tampão citrato 50 mM.

#### 5.4.1.3. Terceiro planejamento

Foi realizado um novo planejamento buscando encontrar faixas de temperatura e pH que maximizem a atividade da enzima. Na Tabela 14, encontram-se os valores codificados e os reais das variáveis independentes de cada ensaio e as respectivas respostas obtidas. Para obtenção dos diversos níveis de pH, utilizou-se o tampão citrato 50 mM.

**Tabela 14.** Matriz do terceiro delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AAD<sub>5</sub>.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade enzimática (UI)
	Temperatura (°C)	pH	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	
1	55	3,8	-1	-1	1,09
2	75	3,8	1	-1	0,26
3	55	5,8	-1	1	1,50
4	75	5,8	1	1	0,62
5	50	4,8	-1,41	0	1,57
6	80	4,8	1,41	0	0,67
7	65	3,4	0	-1,41	0,13
8	65	6,2	0	1,41	1,72
9	65	4,8	0	0	2,47
10	65	4,8	0	0	2,65
11	65	4,8	0	0	2,23

Obteve-se a Tabela 15 para os coeficientes de regressão estatisticamente significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) a partir dos dados da tabela anterior e elaborou-se um modelo com as variáveis codificadas (Equação 5.2). Como podemos observar, somente a interação entre as variáveis não foi estatisticamente significativa.

**Tabela 15.** Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a  $p < 0,05$ .

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	2,45	0,16	15,74	<0,00001
$x_1$ (L)	-0,37	0,10	-3,91	0,00793
$x_1$ (Q)	-0,70	0,11	-6,20	0,00081
$x_2$ (L)	0,38	0,10	3,96	0,00748
$x_2$ (Q)	-0,80	0,11	-7,05	0,00041

$$\text{Atividade} = 2,449 - 0,372 \cdot T(L) - 0,703 \cdot T(Q) + 0,377 \cdot pH(L) - 0,799 \cdot pH(Q) \quad \mathbf{5.2}$$

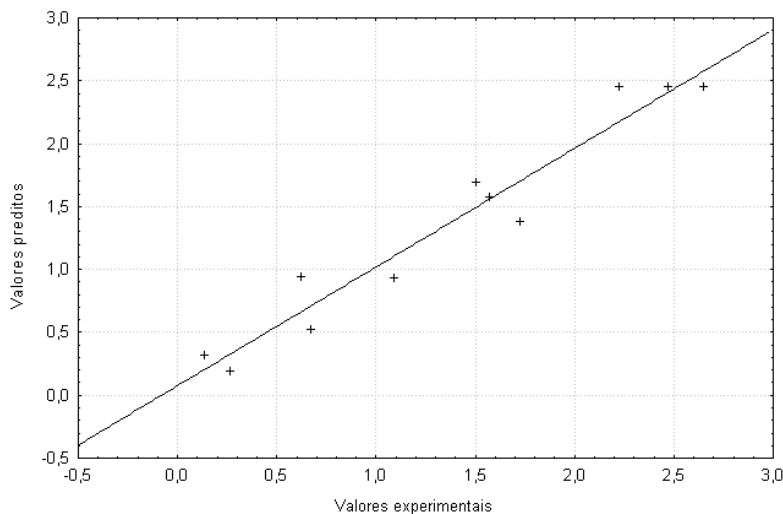
Este modelo, que descreve a atividade em função do pH e da temperatura, é considerado adequado ao analisarmos a ANOVA com os parâmetros estatisticamente significativos (Tabela 16). A porcentagem de variação explicada é de 94,30% e o  $F_{\text{calculado}}$  (24,80) é maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$  (4,53), satisfazendo os requisitos para a construção da superfície e curvas de resposta (Figura 33).

**Tabela 16.** ANOVA considerando os coeficientes de regressão com  $p < 0,05$ .

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	7,21	4	1,80	24,80
Resíduos	0,44	6	0,07	-
Total	7,64	10	-	-

$F_{4;6;0,05} = 4,53$  ; variação explicada ( $R^2$ ) = 94,30%

A Figura 32 apresenta os resultados experimentais *versus* os resultados previstos pelo modelo ajustado mostrando uma boa coerência entre eles.

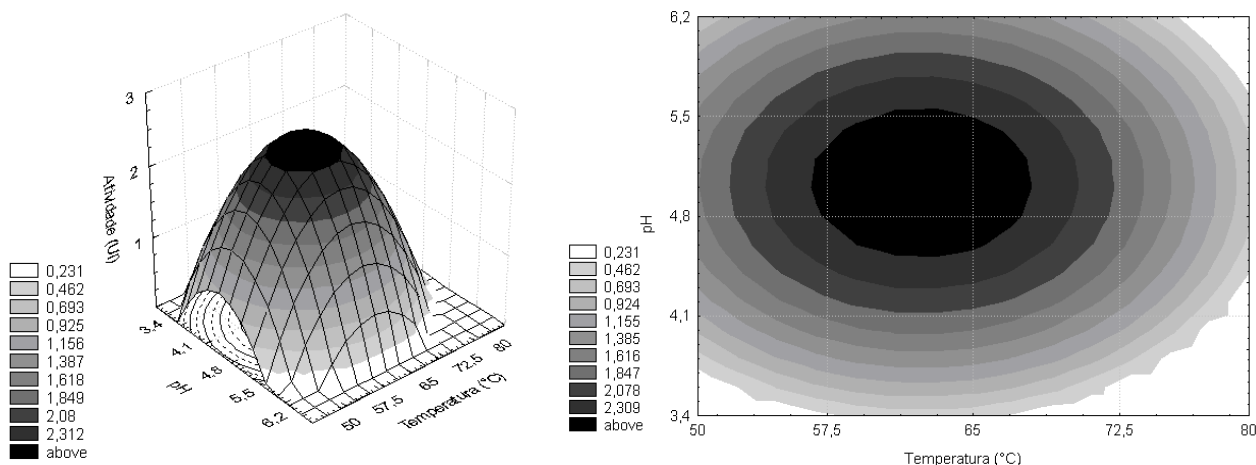


**Figura 32.** Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado do terceiro delineamento experimental para o microrganismo AAD<sub>5</sub>.

Pela análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 33), verifica-se que os maiores valores de atividade enzimática são obtidos quando se aplica temperatura e pH nos níveis do ponto central, ou seja, em torno de 65°C e pH de 4,8. Pode-se considerar válida a condição indicada como ótima visto que foram realizados três ensaios no ponto central e as respostas obtidas possuem boa repetibilidade.

Estes resultados diferem dos encontrados por Li *et al.* (2007) e Heck *et al.* (2006), já que o primeiro estudou a xilanase produzida por *Penicillium oxalicum* ZH-30 e esta tinha sua atividade enzimática reduzida a temperaturas acima de 55°C. Já Heck *et al.* (2006) estudou xilanases produzidas por *Bacillus circulans* BL53, e obteve dados que comprovassem uma faixa ótima de atividade entre 40 – 80°C.

Comparando estes dados, percebemos como as xilanases produzidas por diferentes microrganismos podem possuir características antagônicas. Por isso, deve-se compreender o processo no qual a enzima irá atuar para poder escolhê-la de acordo com suas características.



**Figura 33.** Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AAD<sub>5</sub> no terceiro delineamento experimental.

### 5.4.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da xilanase foi estudada através determinação do tempo de meia vida da enzima. De cada solução incubada, foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados, analisadas quanto à atividade enzimática e, posteriormente, determinou-se as constantes de desativação térmica ( $K_d$ ) para cada temperatura, a meia-vida em função da temperatura ( $t_{1/2}$ ), a energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ), a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), a entalpia ( $\Delta H$ ) e a entropia ( $\Delta S$ ).

Para esta cepa as enzimas foram avaliadas nas temperaturas 52, 57, 60, 65 e 70°C. Os resultados obtidos em diferentes temperaturas estão apresentados nas Tabela 17 a Tabela 21. Na Figura 34 é mostrado um exemplo do cálculo de  $K_d$ .

**Tabela 17.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 52°C.

Tempo (min)	V ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ )	V/V <sub>0</sub>	$-\ln(V/V_0)$
0	2,13	1,00	0,00
1530	0,85	0,40	0,91
2580	0,53	0,25	1,38



**Tabela 18.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 57°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	2,05	1,00	0,00
10	1,57	0,77	0,26
20	1,30	0,64	0,45
40	0,97	0,48	0,74
70	0,74	0,362	1,02

**Tabela 19.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 60°C.

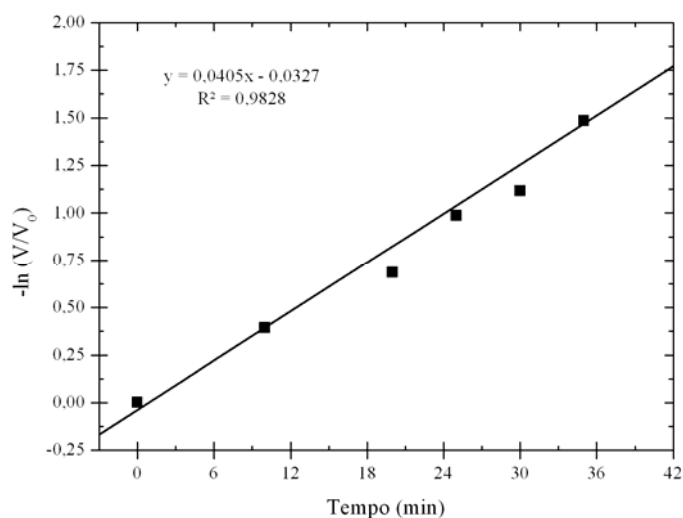
Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	2,35	1,00	0,00
10	1,59	0,67	0,39
20	1,19	0,50	0,68
25	0,88	0,37	0,98
30	0,77	0,32	1,11
35	0,53	0,22	1,48

**Tabela 20.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 65°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	2,34	1,00	0,00
3	1,75	0,75	0,28
4	1,45	0,62	0,47
5	1,22	0,52	0,64
8	0,80	0,34	1,06
9	1,14	0,49	0,71
10	1,31	0,56	0,58

**Tabela 21.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 70°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	2,52	1,00	0,00
1	2,05	0,81	0,20
3	1,19	0,47	0,74
4	0,98	0,39	0,94

**Figura 34.** Efeito da temperatura em função do tempo de incubação da xilanase do microrganismo AAD<sub>5</sub>, para o cálculo da constante de desativação para temperatura de 60°C.

Em posse do valor de  $K_d$  – coeficiente angular da linearização de  $\ln(V/V_0)$  versus tempo –, foi possível a determinação do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima a cada temperatura utilizando a equação 2.10. Posteriormente, através da equação de Arrhenius (equação 2.11), determinou-se o valor de  $E_{ad}$ .

Com a obtenção do valor de  $E_{ad}$  para o microrganismo AAD<sub>5</sub>, utilizaram-se as equações 2.15, 2.20, e 2.21, respectivamente, para determinação dos valores de  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$ .

**Tabela 22.** Valores obtidos de  $K_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  para xilanase produzida pelo AAD<sub>5</sub> a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (horas)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol.K)
52	0,0005	21,334	111,26	297,13	571,64
57	0,0181	0,637	103,38	297,09	586,73
60	0,0405	0,285	102,11	297,06	585,17
65	0,1358	0,085	100,29	297,02	581,79
70	0,2421	0,048	100,16	296,98	573,55

Valores similares de  $t_{1/2}$  a 52°C foram encontrados por Ryan *et al.* (2003), todavia Sudan & Bajaj (2007) estimaram para sua enzima um  $t_{1/2}$  de 48 minutos à 50°C enquanto Salles *et al.* (2000) observou valores de 44 horas a 55°C. Estes valores discrepantes são encontrados devido à diferenciação dos microrganismos utilizados.

Analisando as constantes termodinâmicas da Tabela 22 observa-se que com o aumento da temperatura há redução da energia livre, indicando assim maior estabilidade a temperaturas mais brandas. Além disso, a entropia ( $\Delta S$ ) aumenta até a temperatura de 57 °C e, posteriormente, seu valor decresce suavemente. Uma vez que o aumento do  $\Delta S$  pela desnaturação é devido à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento das proteínas, os resultados apontam a temperatura de 57 °C como crítica para a destruição da enzima.

Já para a entalpia, podemos concluir que esta não é fortemente dependente da temperatura, no sistema em que se encontra a enzima, pois seu valor praticamente não varia.

De acordo com Cobos & Estrada (2003) os valores de  $\Delta S$  deveriam diminuir com o aumento da temperatura, porém a 52°C este valor é menor do que a 57°C. Isto acontece porque os valores de energias  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  foram obtidos em função do  $K_d$  calculado a partir dos dados experimentais. Por isso, é provável que algum erro experimental tenha se refletido nos cálculos.

#### 5.4.3. Estabilidade a diferentes pH

As enzimas produzidas pelo microrganismo AAD<sub>5</sub> foram incubadas em diferentes soluções de tampão citrato 50 mM que possuíam pH com os valores de 4,0; 4,5; 5,3; 5,7 e 6,0.

A temperatura foi controlada em banho termostaticado à 52°C. Foram retiradas amostras em intervalos pré-determinados e suas atividades enzimáticas avaliadas. Com estes resultados pôde-se determinar por meio das equações 3.9 e 3.10 a meia-vida da enzima para cada pH.

Os resultados obtidos em diferentes valores de pH estão apresentados nas Tabelas 23 a 27.

**Tabela 23.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função da incubação no pH 4,0.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	1,82	1,00	0,00
360	0,64	0,35	1,04
1800	0,57	0,31	1,16

**Tabela 24.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função da incubação no pH 4,5.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	1,82	1,00	0,00
1260	0,84	0,46	0,77
1800	0,67	0,36	0,99

**Tabela 25.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função da incubação no pH 5,3.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	1,82	1,00	0,00
360	1,04	0,57	0,56
1260	0,52	0,28	1,25
1800	0,44	0,24	1,40

**Tabela 26.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função da incubação no pH 5,7.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	1,82	1,00	0,00
1260	0,51	0,28	1,25
1800	0,43	0,23	1,44

**Tabela 27.** Atividade enzimática da cepa AAD<sub>5</sub> em função da incubação no pH 6,0.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	1,82	1,00	0,00
360	0,63	0,34	1,06
1260	0,18	0,10	2,28
1800	0,02	0,01	4,19

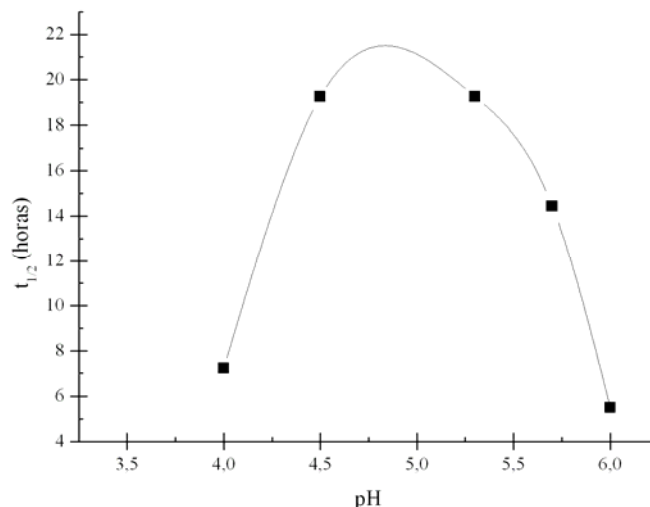
Em posse do valor de  $K_d$  – coeficiente angular da linearização de  $\ln(V/V_0)$  versus tempo –, foi possível a determinação do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima a cada temperatura utilizando a equação 2.10.

Na Tabela 28 encontram-se os valores determinados do tempo de meia-vida e  $K_d$  da enzima a diferentes pH, na temperatura de 52°C;

**Tabela 28.** Valores obtidos de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para diferentes pH de incubação da enzima produzida pela cepa AAD<sub>5</sub>.

pH	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (horas)
4,0	0,0016	7,220
4,5	0,0006	19,254
5,3	0,0006	19,254
5,7	0,0008	14,441
6,0	0,0021	5,501

Pela Figura 35 pode-se verificar a variação do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub> em função dos diferentes pH de incubação.



**Figura 35.** Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub> em função do pH de incubação.

Nota-se que o pH no qual a enzima é mais estável está entre 4,5 e 5,3 e, de acordo com o item 5.4.1.3, este valor está muito próximo da faixa determinada como ótima para a atividade enzimática. Assim, a enzima pode ser incubada em sua condição ótima sem que ocorra perda significativa da estabilidade devido ao pH do meio.

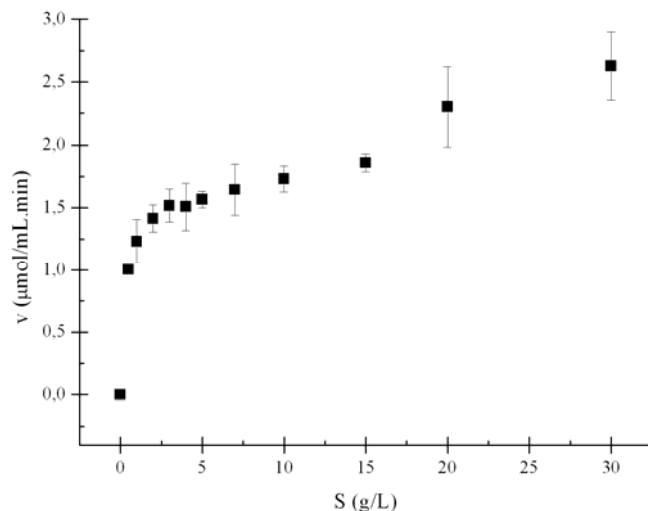
#### 5.4.4. O efeito da concentração do substrato em relação à ação da enzima

O efeito da concentração do substrato foi avaliado conforme item 4.6.4. Os resultados obtidos com as diferentes concentrações de substrato (xilana) estão apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29.** Valores de atividade enzimática em função da concentração de xilana para o microrganismo AAD<sub>5</sub>.

Concentração de xilana (g/L)	0,5	1	2	3	4	5	7	10	15	20	30
Atividade mmol/mL.min	1,00	1,23	1,41	1,51	1,50	1,56	1,64	1,73	1,86	2,30	2,62

Com estes resultados foi possível construir o gráfico de  $v$  versus  $S$  (Figura 36) e, utilizando a metodologia de linearização de Lineweaver-Burk (item 2.5.2) a Figura 37.



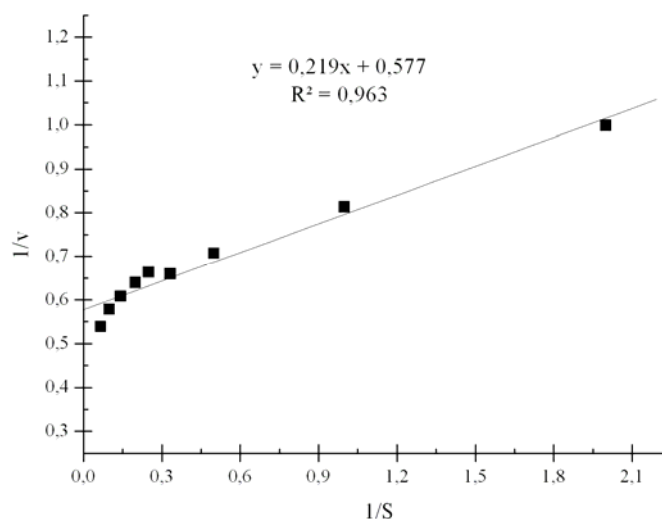
**Figura 36.** Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub>.

A enzima segue a cinética proposta por Michaelis & Menten se for desconsiderado a os pontos referentes a 20 e 30 g/L. Esta desconsideração foi feita visto que a cinética apresentada não se adequava a nenhuma estudada na literatura e, provavelmente, como a caracterização enzimática foi feita no extrato enzimático bruto, é possível que haja isoenzimas presentes, estando estas atuando de forma cooperativa. Todavia, outra hipótese, é que as quantidades de substrato estudadas são inferiores à concentração de saturação da enzima, ou seja, poderia se adicionar maior quantidade de substrato e ainda ocorreria aumento da atividade enzimática. Porém, neste caso, existe o problema de solubilização do substrato no tampão utilizado.

Para total compreensão é necessário a realização de trabalhos futuros para purificação e posterior comparação das cinéticas das enzimas purificadas com a do extrato bruto.

Sendo assim, considerou-se apenas uma enzima que segue a cinética proposta por Michaelis & Menten e, por isso, realizou-se a linearização proposta por Lineweaver-Burk (Figura 37).

A regressão linear obtida na Figura 37 é do tipo:  $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{S} + b$ , onde o coeficiente angular corresponde ao termo  $\frac{K_m}{v_{max}}$  e o coeficiente linear ao valor  $\frac{1}{v_{max}}$ . Portanto, a enzima possui  $K_m$  e  $v_{max}$  de 0,379 g/L e 1,73  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ , respectivamente.



**Figura 37.** Linearização de Lineweaver-Burk no gráfico de  $v$  versus  $S$  da enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub>.

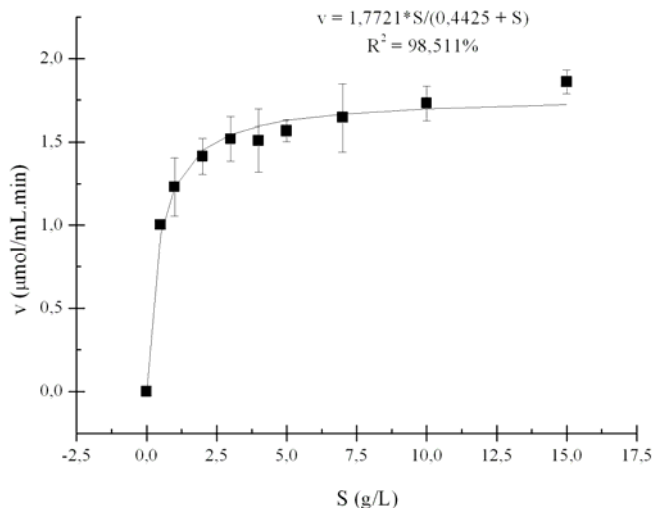
Porém, este método de linearização direta dos dados experimentais obtidos pode induzir a erros. Por isso, as constantes foram recalculadas utilizando o software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) partindo-se da equação 2.3 e, na Tabela 30, estão as constantes  $K_m$  e  $v_{max}$  determinadas.

**Tabela 30.** Valores estimados de  $K_m$  e  $v_{max}$  estimados por meio do programa Statistica.

	$K_m$ (g/L)	$v_{max}$ ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ )
Valores estimados	0,442	1,77
$R^2 = 98,511\%$		

Na Figura 38 encontra-se o modelo ajustado pelo programa Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) a partir dos dados experimentais.





**Figura 38.** Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub> gerado pelo programa Statistica.

Ryan *et al* (2003) encontrou  $v_{max}$  de 14,83 a 31,94 ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ) e  $K_m$  de 7,02 a 25,13 (g/L) para a enzima produzida pelo microrganismo *Penicillium capsulatum*. Esta variação foi encontrada em função dos diferentes tipos de xilana utilizados como substrato. Diferentemente, a enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub> teve valores de  $v_{max}$  e  $K_m$  de 1,77  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e 0,4425 g/L, respectivamente. Deve-se levar em consideração que Ryan *et al* (2003) utilizou a enzima purificada para realização de seu trabalho.

### 5.5. Caracterização da enzima xilanase produzida pela cepa AY<sub>10</sub>

Da mesma forma que realizado para a cepa AAD<sub>5</sub>, descongelou-se a amostra de 10 mL a temperatura ambiente e procedeu-se a caracterização da mesma quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidade à temperatura e pH e efeito da concentração de substrato na velocidade enzimática.

#### 5.5.1. Determinação da temperatura e pH ótimos

Sabendo-se que o terceiro planejamento para o microrganismo AAD<sub>5</sub> foi bem sucedido, optou-se por realizá-lo também para a cepa AY<sub>10</sub>. Como no primeiro caso, utilizou-se para obtenção dos diversos níveis de pH o tampão citrato 50 mM.

Os valores codificados e os reais das duas variáveis independentes e as respostas obtidas para cada ensaio estão expressos na Tabela 31.

**Tabela 31.** Matriz do delineamento (valores reais e codificados) e as respostas obtidas para a cepa AY<sub>10</sub>.

Ensaio	Valores reais		Valores codificados		Atividade enzimática (UI)
	Temperatura (°C)	pH	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	
1	55	3,8	-1	-1	1,84
2	75	3,8	1	-1	2,55
3	55	5,8	-1	1	2,34
4	75	5,8	1	1	4,32
5	50	4,8	-1,41	0	2,03
6	80	4,8	1,41	0	5,54
7	65	3,4	0	-1,41	2,05
8	65	6,2	0	1,41	3,24
9	65	4,8	0	0	3,77
10	65	4,8	0	0	3,52
11	65	4,8	0	0	3,77

Os dados da tabela anterior foram utilizados para construção da Tabela 32, onde se encontram os coeficientes de regressão estatisticamente significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). De posse desses coeficientes, elaborou-se o modelo que correlaciona a atividade enzimática às variáveis temperatura e pH, conforme equação 5.3.

**Tabela 32.** Coeficientes de regressão estatisticamente significativos a  $p < 0,05$ .

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	3,63	0,20	18,34	<0,00001
x <sub>1</sub> (L)	0,96	0,17	5,75	0,00070
x <sub>2</sub> (L)	0,50	0,17	2,97	0,02075
x <sub>2</sub> (Q)	-0,62	0,19	-3,25	0,01404

$$Atividade = 3,632 + 0,959 \cdot T(L) + 0,496 \cdot pH(L) - 0,619 \cdot pH(Q)$$

**5.3**

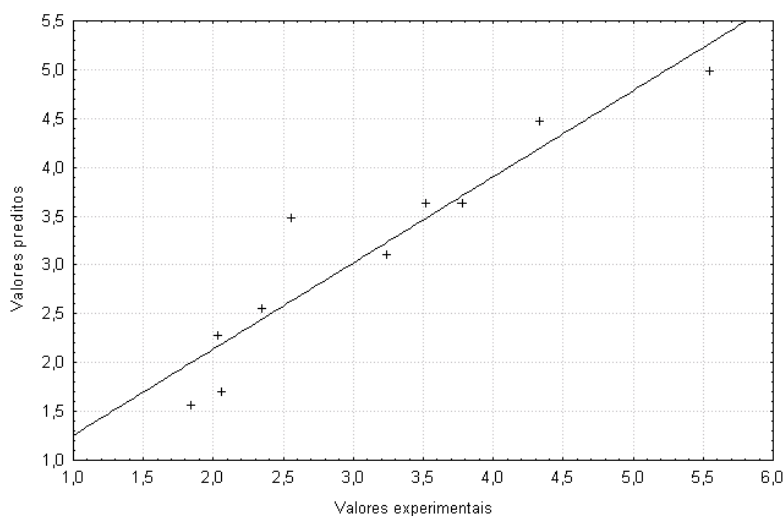
A ANOVA (Tabela 33) correspondente ao modelo com os termos estatisticamente significativos indica que a variação explicada (88,21%) e o  $F_{\text{calculado}}$  (17,45), maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (4,35), são adequados para avaliação da tendência da resposta.

**Tabela 33.** ANOVA considerando os coeficientes de regressão com  $p < 0,05$ .

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	11,63	3	3,88	17,45
Resíduos	1,56	7	0,22	-
Total	13,19	10	-	-

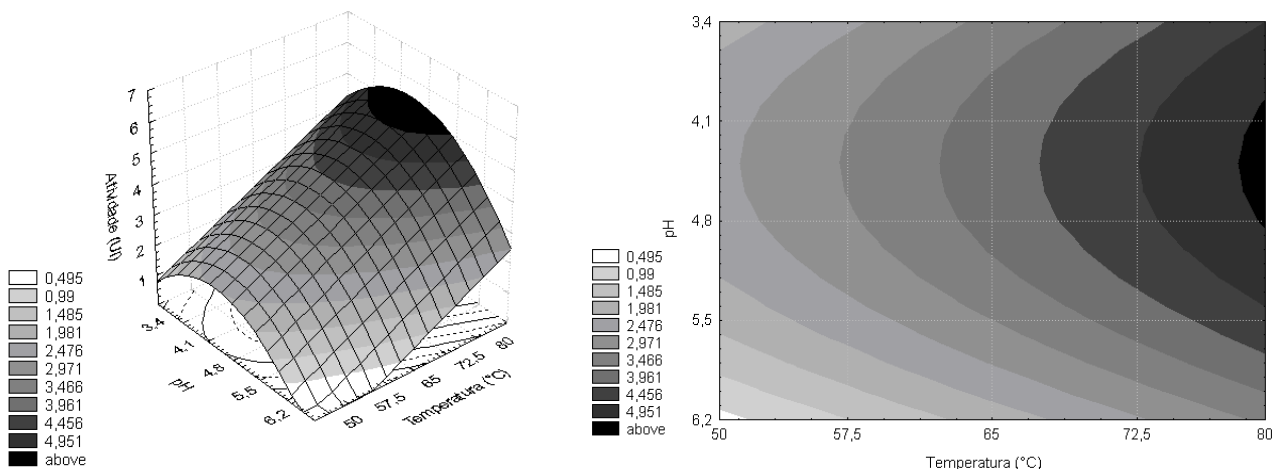
$F_{3, 7, 0,05} = 4,35$  ; variação explicada ( $R^2$ ) = 88,21%

A Figura 39 apresenta os resultados experimentais *versus* os resultados obtidos pelo modelo ajustado, onde podemos perceber que há uma boa concordância entre eles.



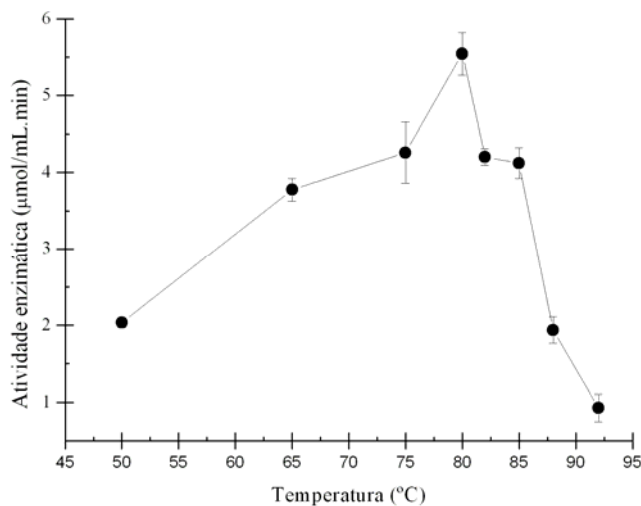
**Figura 39.** Valores experimentais de atividade enzimática em função dos valores previstos pelo modelo ajustado do delineamento experimental para o microrganismo AY<sub>10</sub>.

Assim, foi possível construir a superfície de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática em função do pH e da temperatura (Figura 40), onde se visualiza que os maiores valores da variável dependente foram encontrados para os ensaios realizados próximo ao ponto central da faixa de pH e altas temperaturas (nível +1,414).



**Figura 40.** Superfície de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática em função da temperatura e pH do microrganismo AY<sub>10</sub>.

Conhecendo este comportamento e, a fim de confirmar que um alto valor de atividade pode ser obtido à temperatura próxima de 80°C, realizou-se um novo experimento no qual o pH foi fixado em 4,8 e variou-se a temperatura de 50°C a 85°C. Os resultados encontrados foram graficados em função da temperatura e obteve-se a curva conforme Figura 41.



**Figura 41.** Atividade enzimática da xilanase produzida pela cepa AY<sub>10</sub> em função da temperatura, com pH fixo em 4,8.

O gráfico, assim como a superfície de resposta (Figura 40) indicou que o aumento da temperatura favorece a atividade enzimática. No entanto, através deste foi possível concluir que em temperaturas acima de 80°C a atividade decai significativamente. Portanto, similarmente aos resultados encontrados por Heck *et al.* (2006), onde a temperatura ótima

estava na faixa de 40 – 80°C e pH de 5,0 – 8,0, a maior atividade enzimática foi obtida a pH 4,8 e temperatura de 80°C.

### 5.5.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da xilanase produzida pela cepa AY<sub>10</sub> foi avaliada da mesma maneira como a enzima produzida pelo microrganismo AAD<sub>5</sub>, porém as temperaturas avaliadas para a cepa AY<sub>10</sub> foram 70, 72, 75 77, 80 e 85 °C. Os resultados obtidos em diferentes temperaturas estão apresentados nas Tabela 34 a Tabela 39.

**Tabela 34.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 70°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	3,92	1,00	0,00
360	2,44	0,62	0,47
1440	1,77	0,45	0,79
2880	0,93	0,23	1,43

**Tabela 35.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 72°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	3,93	1,00	0,00
870	0,75	0,19	1,66
1260	0,67	0,17	1,76

**Tabela 36.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 75°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	4,12	1,00	0,00
10	2,77	0,67	0,39
20	2,42	0,58	0,52
40	1,57	0,38	0,96
50	1,37	0,33	1,10
70	0,82	0,19	1,61
80	0,63	0,15	1,88

**Tabela 37.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 77°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	4,55	1,00	0,00
5	4,04	0,88	0,11
15	3,14	0,69	0,37
20	2,21	0,48	0,72
30	1,61	0,35	1,03
35	1,28	0,28	1,26
40	1,30	0,28	1,24

**Tabela 38.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 80°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	3,83	1,00	0,00
5	2,92	0,76	0,27
10	1,78	0,46	0,76
15	0,85	0,22	1,49
20	0,75	0,19	1,62
30	0,49	0,12	2,04

**Tabela 39.** Atividade enzimática da cepa AY<sub>10</sub> em função do tempo de incubação a temperatura de 85°C.

Tempo (min)	V (μmol/mL.min)	V/V <sub>0</sub>	-ln(V/V <sub>0</sub> )
0	5,04	1,00	0,00
1	4,80	0,95	0,04
3	3,51	0,69	0,36
4	3,27	0,64	0,43
5	2,80	0,55	0,58
6	2,17	0,43	0,84
7	1,96	0,39	0,94
8	1,45	0,28	1,24
9	1,28	0,25	1,36
10	1,47	0,29	1,23

Para o cálculo das constantes  $K_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $E_{ad}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  o procedimento realizado foi o mesmo utilizado para a xilanase do microrganismo AAD<sub>5</sub> (item 5.4.2) e os valores estimados encontram-se na Tabela 40.

**Tabela 40.** Valores obtidos de  $K_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  para xilanase produzida pelo AY<sub>10</sub> a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (horas)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol.K)
70	0,00103	11,21	115,74	361,92	717,40
72	0,00148	7,80	115,39	361,90	714,21
75	0,02212	0,52	108,59	361,88	727,51
77	0,03447	0,33	107,94	361,86	725,17
80	0,07313	0,15	106,68	361,84	722,50
85	0,15703	0,07	105,96	361,79	714,32

A comparação dos valores de  $t_{1/2}$  encontrados com os da literatura indicam que a xilanase produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> é termoestável. Isso se confirma, pois, apesar de Heck *et al.* (2006) ter encontrado uma temperatura ótima na faixa de 40 – 80°C, a enzima é pouco estável a 80°C, sendo que após cinco minutos de incubação nesta temperatura, esta possui somente 20% de atividade em relação à inicial. Diferentemente, a enzima produzida pela cepa AY<sub>10</sub> possui 75% da atividade em relação ao tempo inicial, após 5 minutos de incubação, nesta mesma temperatura.

Analisando as constantes termodinâmicas da Tabela 40 observa-se que com o aumento da temperatura há redução da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indicando assim maior estabilidade a temperaturas mais baixas, como descritas por Cobos & Estrada (2003). Além disso, a entropia ( $\Delta S$ ) aumenta até a temperatura de 75 °C e, posteriormente, seu valor decresce suavemente. Uma vez que o aumento do  $\Delta S$  pela desnaturação é devido à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento das proteínas, os resultados apontam a temperatura de 75°C como crítica para a destruição da enzima.

Já para a entalpia, podemos concluir que esta não é fortemente dependente da temperatura, no sistema em que se encontra a enzima, pois seu valor praticamente não varia.

### 5.5.3. Estabilidade a diferentes pH

Para avaliação das enzimas produzidas pelo microrganismo AY<sub>10</sub> procedeu-se de maneira similar ao produzido pela cepa AAD<sub>5</sub>, conforme item 5.4.3. As enzimas foram incubadas em diferentes soluções de tampão citrato 50 mM que possuíam pH com os valores de 3,5; 4,0; 4,5; 5,3; 5,7 e 6,0. A temperatura foi controlada em banho termoestabilizado à 72°C. Foram retiradas amostras em intervalos pré-determinados e suas atividades enzimáticas avaliadas. Com estes resultados pôde-se determinar por meio das equações 3.9 e 3.10 a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) e a meia-vida para cada pH.

Na Tabela 41 encontram-se os valores determinados do tempo de meia-vida e  $K_d$  da enzima a diferentes pH, na temperatura de 52°C;

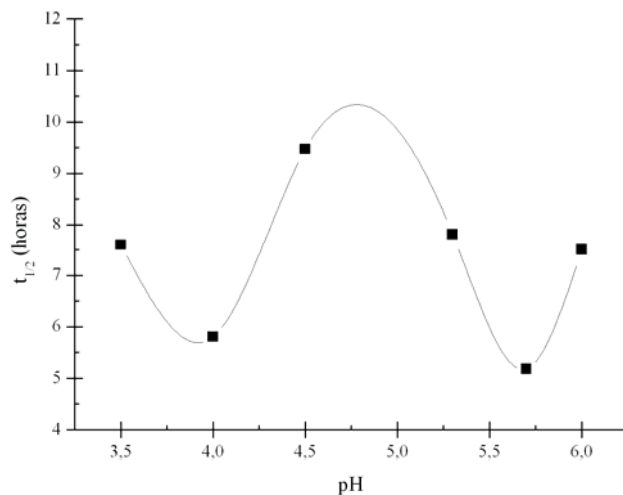
**Tabela 41.** Valores obtidos de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para diferentes pH de incubação da enzima produzida pela cepa AY<sub>10</sub>.

pH	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (horas)
3,5	0,0015	7,60
4,0	0,0020	5,80
4,5	0,0012	9,46
5,3	0,0015	7,80
5,7	0,0022	5,18
6,0	0,0015	7,50

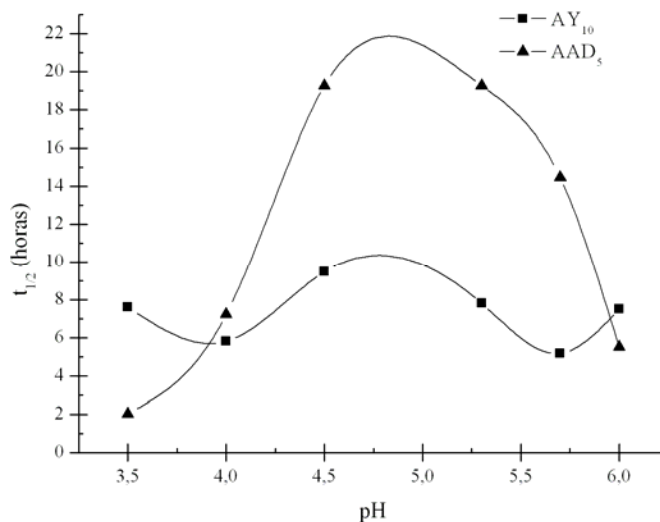
Pela Figura 42 pode-se verificar a variação do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> em função dos diferentes pH de incubação.

Como para uma pequena variação no  $K_d$  obtêm-se uma elevada diferença no  $t_{1/2}$  e, como os valores de meia-vida da enzima produzidos pela cepa AY<sub>10</sub> possuem pouca amplitude se comparados com os do microrganismo AAD<sub>5</sub>, conclui-se que esta variação é devida a erros experimentais, como mostrada na Figura 44.





**Figura 42.** Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> em função do pH de incubação.



**Figura 43.** Efeito do tempo de meia-vida da enzima produzida pelos microrganismos AY<sub>10</sub> e AAD<sub>5</sub> em função do pH de incubação.

Sendo assim, a enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> pode ser considerada estável com relação à variação de pH na faixa de 3,5 – 6,0.

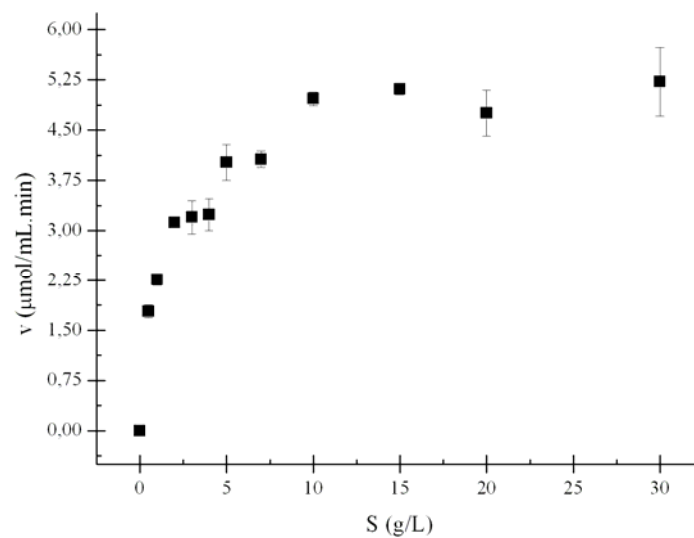
#### 5.5.4. O efeito da concentração do substrato em relação à ação da enzima

O efeito da concentração do substrato foi avaliado conforme item 4.6.4. Os resultados obtidos com as diferentes concentrações de substrato (xilana) estão apresentados na Tabela 42.

**Tabela 42.** Valores de atividade enzimática em função da concentração de xilana para o microrganismo AY<sub>10</sub>.

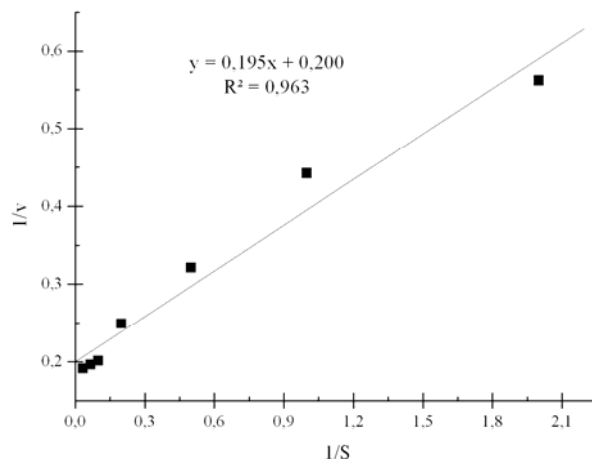
Concentração de xilana (g/L)	0,5	1	2	3	4	5	7	10	15	20	30
Atividade mmol/mL.min	1,77	2,26	3,12	3,19	3,23	4,01	4,06	4,96	5,11	4,75	5,22

Com estes resultados foi possível construir o gráfico de  $v$  versus  $S$  (Figura 44) e, a partir da visualização do mesmo, concluiu-se que a cinética enzimática segue o modelo proposto por Michaelis & Menten.



**Figura 44.** Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub>.

Por isso, utilizou-se a metodologia de linearização de Lineweaver-Burk (item 2.5.2) na Figura 45, para determinar as constantes cinéticas.



**Figura 45.** Linearização de Lineweaver-Burk no gráfico de  $v$  versus  $S$  da enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub>.

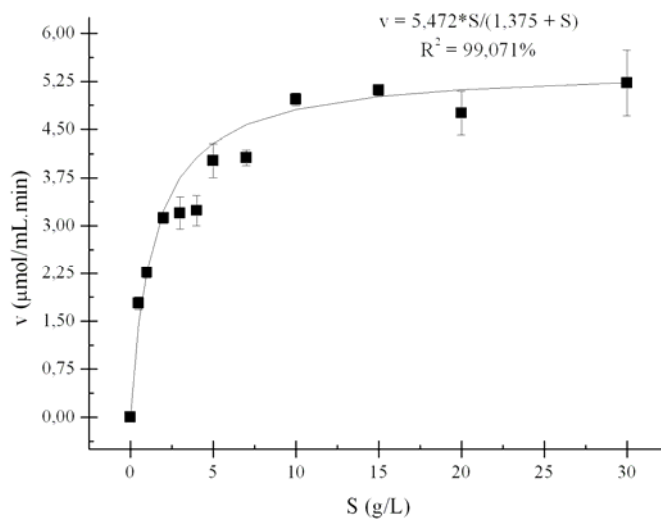
A regressão linear obtida na Figura 45 é do tipo:  $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{S} + b$ , onde o coeficiente angular corresponde ao termo  $\frac{K_m}{v_{max}}$  e o coeficiente linear ao valor  $\frac{1}{v_{max}}$ . Portanto, a enzima possui  $K_m$  e  $v_{max}$  de 0,97 g/L e 5,0  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ , respectivamente.

Porém, este método de linearização direta dos dados experimentais obtidos pode induzir a erros. Por isso, as constantes foram recalculadas utilizando o software Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) partindo-se da equação 2.3 e, na Tabela 43, estão as constantes  $K_m$  e  $v_{max}$  determinadas.

**Tabela 43.** Valores estimados de  $K_m$  e  $v_{max}$  estimados por meio do programa Statistica.

	$K_m$ (g/L)	$v_{max}$ ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ )
Valores estimados	1,375	5,47
$R^2 = 99,071\%$		

Na Figura 46 encontra-se o modelo ajustado pelo programa Statistica 5.5 (STATSOFT, 2000) a partir dos dados experimentais.



**Figura 46.** Efeito da concentração na velocidade de reação da enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> gerado pelo programa Statistica.

Franco *et al* (2004) encontraram  $v_{max}$  de 10,93 ( $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ ) e  $K_m$  de 1,61 (g/L) para a enzima produzida pelo microrganismo *Trichoderma harzianum*. Diferentemente, a enzima produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub> obteve valores de  $v_{max}$  e  $K_m$  de 5,472  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e 1,375 g/L, respectivamente. Como Franco *et al* (2004) trabalharam com a enzima purificada, esta possui  $v_{max}$  maior do que a xilanase produzida pelo microrganismo AY<sub>10</sub>, porém a afinidade ao substrato ( $K_m$ ) é menor.

## 6. CONCLUSÕES

Baseado nos dados experimentais obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- Há um estoque promissor para produção em larga escala de produtos de grande interesse biotecnológico a partir das 349 cepas de leveduras do banco de culturas;
- As cepas AY<sub>10</sub> e AAD<sub>5</sub> produzem xilanases com atividades enzimáticas superiores às demais quando submetidas a crescimento em meio enriquecido sob agitação de 150 rpm e 30°C;
- A cepa AAD<sub>5</sub> possui ótima atividade enzimática à temperatura na faixa de 57,5 a 67,5°C e pH entre 4,5 e 5,5. No pH de 5,3, sua enzima possui uma meia-vida de 21,33 horas a 52°C e, 5,1 minutos a 65°C. Além disso, à temperatura constante, sua estabilidade varia em função do pH, tendo seu ótimo entre 4,5 – 5,3.
- Já o microrganismo AY<sub>10</sub> possui ótima atividade enzimática à temperatura de 80°C e pH entre 4,1 e 4,8. No pH de 5,3, sua enzima possui meia-vida de 11,21 horas a 70°C e 4,38 minutos a 80°C. Diferentemente à enzima da cepa AAD<sub>5</sub>, à temperatura constante, a estabilidade da enzima do microrganismo AY<sub>10</sub> não varia em função do pH;
- As enzimas produzidas pelas cepas AAD<sub>5</sub> e AY<sub>10</sub> seguem a cinética proposta por Michaelis & Menten. A primeira possui  $v_{max}$  e  $K_m$  de 1,77  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e 0,44 g/L respectivamente. Já a segunda cepa obteve respectivamente 5,47  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$  e 1,37 g/L de  $v_{max}$  e  $K_m$ .
- Estes resultados demonstram o potencial de aplicação de leveduras na produção de xilanase, porém, para as cepas estudadas, há a necessidade de purificação das enzimas produzidas para que estas sejam aplicadas industrialmente.

### Sugestões para trabalhos futuros

- Taxonomia dos microrganismos selecionados, AAD<sub>5</sub> e AY<sub>10</sub>;
- Otimização da produção enzimática com diferentes condições experimentais e meios de cultura em bioreatores;
- Purificação das enzimas produzidas e comparação dos resultados com os realizados a partir do extrato bruto.

- Verificar se as cepas escolhidas produzem etanol a partir da xilose, monossacarídeo formado a partir da hidrólise da xilana. Assim, estes microorganismos poderiam ser utilizados para a produção de álcool a partir de biomassa.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [STATSOFT, INC.]; **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]; USA, 2000.
- ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk and Food Technology**, vol. 38, nº. 10, p. 570 – 572, 1975.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLS, N. F.; **Biochemical engineering**. New York, Academic Press, 434 p., 1973.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, vol. 23, p. 257 – 270, 1992.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S.; Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, vol. 56, p. 326 – 338, 2001.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S.; **Biochemical Engineering**; Marcel Dekker; New York; 702 p., 1997.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. Experimental design for the exploration and exploitation of response surfaces. **In: CHEW, V. Experimental design in industry**. New York: John Wiley & Sons, p. 138-190, 1957.
- BRECCIA, J.D.; CASTRO, G.R.; BAIGORÍ, M.D.; SIÑERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**, vol. 78, p. 469 – 472, 1995.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C.; **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. E-Papers Serviços, Rio de Janeiro, 260 p., 2003.

- CASTRO, M. M. S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica**. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- CHEN, W.; LIU, C. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol.18, nº. 02, p.153 – 160, 1996.
- COBOS, A.; ESTRADA, P.; Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoferma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 33, p. 810 – 818, 2003.
- CORNISH-BOWDEN, A.; CÁRDENAS, M.L.; **Handling Equilibrium Processes Embedded in Metabolic Systems**, The Chemical Theatre of Biological Systems; May 24<sup>th</sup>-28<sup>th</sup>; 2004.
- COSTA, F.A.A. **Estudo de otimização do meio de cultura para produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica***. 181 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA Jr., N.; Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 33, p. 333 – 338, 2002.
- DIXON, M.; WEBB, E.C.; **Enzymes**; 3<sup>rd</sup> Ed.; Academic Press; New York; 1116 p., 1979.
- DORAN, P. M.; **Bioprocess Engineering Principles**; Academic Press; New York; 439 p., 2002.
- DUARTE, M. C. T.; PELLEGRINO, A. C. A.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; FRANCO, T. T. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 31, p. 90 – 94, 2000.



- DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; FRANCO, T. T.; Otimização da produção de xilanases alcalinas por diferentes cepas de *Bacillus pumilus*. **In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES**, Uberlândia, 1998.
- FRANCO, P. F.; FERREIRA, H. M.; FERREIRA F<sup>o</sup>, E. X.; Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, vol. 40, p. 255 – 259, 2004.
- GOKHALE, D.V.; PATIL, S.G.; BASTAWDE, K.B. Potential application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. **Bioresource Technology**, vol. 63, p. 187 – 191, 1998.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, vol. 58, p. 167 – 161, 1996.
- HECK, J. X.; SOARES, L.H.B.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z.; Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 32, p. 179 – 184, 2006.
- HERNALSTEENS, S.; **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F. & CARMONA, E. C.; Efeito das condições de cultivo e fontes de carbono na produção de xilanases por *Penicillium sclerotiorum*. **In: Simpósio Nacional de Fermentações**, Curitiba, 2007.
- LEE, S.; LEE, J. Insoluble dye substrate for screening and assay of xylan-degrading enzymes. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 29, p. 1 – 5, 1997.
- LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; XU, Y.; ZHAO, H.; Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp. ZH-30. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 23, p. 837 – 843, 2007.

- LIU, W.; LU, Y.; MA, G. Induction and glucose repression of endo-b-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochemistry**, vol. 34, p. 67 – 72, 1999.
- MACIEL, G. M.; **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja.** 129 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MALTO, M.L. **Estudo da metodologia para caracterização de leveduras da fermentação alcoólica industrial através de taxonomia numérica e potencial fermentativo.** 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- MILLER, G. L.; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n°. 3, p. 426 – 428, 1959.
- MODELL, M.; REID, R. C.; **Thermodynamics and its applications**, Prentice-Hall; 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey; 448 p.; 1983.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4<sup>a</sup> Ed., p 190 – 193, 2005.
- PEIXOTO, A.B. **Estudo da capacidade produtiva de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil.** 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 67, pp 577 – 591, 2005.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 1561 – 1566, 2004.

- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F.; **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª Ed. Campinas – SP, 2005.
- ROSE, A. H.; HARRISON, J. S.; **Biology of yeasts**, Academic Press, Londres; 423 p; 1987.
- RYAN, S. E.; NOLAN, K.; THOMPSON, R.; GUBITZ, G. M.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G.; Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 33, p. 775 – 785, 2003.
- SALLES, B. C.; CUNHA, R. B.; FONTES, W.; SOUSA, M. V.; FILHO, E. X. F.; Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**, vol. 81, p. 199 – 204, 2000.
- SANTOS, A. M. P., **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus***. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- SCHULZE, E. Information regarding chemical composition of plant cell membrane. **BERDTSCH CHEM GES**, vol. 24, p. 2277 – 2287, 1891.
- SHULER, M. L.; KARGI, F.; **Bioprocess Engineering: basic concepts**; Prentice Hall; New Jersey; 479 p.; 1992.
- SUDAN, R. & BAJAJ, B. K. Production and biochemical characterization of xylanase from an alkalitolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. **World J Microbiol Biotechnol**, vol. 23, p. 491 – 500, 2007.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G.; Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit Rev Biotechnol**, vol. 17, p. 39 – 67, 1997.

VIRUPAKSHI, S.; GIREESH, B.; GAIKWAD S. R., NAIK, G. R.; Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 40, p. 431 – 435, 2005.