



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANNA CAROLINA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO E
EXTRAÇÃO DE XILANASE MICROBIANA

RECIFE – PE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANNA CAROLINA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO E
EXTRAÇÃO DE XILANASE MICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Dra. Polyanna Nunes Herculano – PNP/UFPE
Co-orientador: Dra. Keila Aparecida Moreira – UAG /UFPE

RECIFE – PE
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de
ANNA CAROLINA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO E
EXTRAÇÃO DE XILANASE MICROBIANA

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 25 de fevereiro de 2013

Comissão examinadora, composta pelos seguintes professores:

Prof^a. Polyanna Nunes Herculano

PNPD/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Presidente)

Prof^a. Daniela de Araújo Viana Marques

PNPD/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Membro interno)

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria Souza-Motta

Departamento de Micologia
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Membro externo)

Prof^a Dr^a. Norma Buarque de Gusmão

Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Membro externo)

Aos meus pais, Carlos Alberto e Maria Betânia, que com disciplina e com muito carinho sempre me instruíram e me incentivaram a alcançar grandes conquistas. A Pedro pelo amor e companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Senhor da minha vida; por ter me dado grandes oportunidades e me capacitado a cada momento para enfrentá-las e conquistá-las; por sempre cuidar tão bem de mim, como pai zeloso que é! Por ter me dado a vida e ter permitido que eu a vivesse debaixo da sua graça.

Ao Programa de pós-graduação em Biociência Animal pela oportunidade oferecida para pesquisa e à CAPES PROCAD/NF 2009 Processo 0921/2010 pela bolsa concedida que muito ajudou na realização do projeto.

À Dr^a. Polyanna Nunes Herculano por ter aceitado me orientar de braços abertos e assim ter permitido que um sonho de muitos anos se realizasse.

À professora Keila Moreira, pela co-orientação, cuidado e acompanhamento desde a iniciação científica.

À professora Luciana Souza Vandenberghe e suas alunas Cristine, Valeska e Franciele, por me receberem tão bem em sua universidade (UFPR) e por ter cedido espaço, tempo e material para que meu trabalho fosse realizado durante os dois meses que passei naquela instituição pelo projeto Procad/Novas Fronteiras da CAPES.

À minha tia Ivonete, por ter me acolhido em seu lar e assim permitido que cursasse as disciplinas durante o mestrado.

Aos meus pais Betânia e Carlos Alberto, que me deram amor e educação na medida certa e que sempre me incentivaram e me ajudaram a traçar o caminho por onde estou, ainda, passando. Exemplos sempre lembrados e repetidos. A eles meus agradecimentos, respeito e amor eternos.

Ao meu irmão, Bebeto, por ter tido sempre tanta paciência, compreensão e respeito nos muitos afazeres que acabavam ocupando seu espaço.

A Pedro, meu amor, por sempre ser tão presente e companheiro. Por ter me ajudado com as soluções dos problemas. Por ter sorrido, chorado e sonhado comigo. Por me incentivar tanto e ter acreditado em mim!

Às minhas avós Maria José (*in memoriam*) e Helena Alexandre por terem me amado tanto e me ensinado muito, mas principalmente o que é amar ao próximo. Muitas saudades, vó Zezé!

Aos meus grandes companheiros de laboratório CENLAG/Bioativos: Alana, Camila, Érick; Sheylla e Patrícia; pela paciência, companheirismo e disposição em me ajudar sempre que necessário.

Aos estagiários do CENLAG, em especial Roana, Talita Nayara, Ivaldo, Murilo, Edson e Antônio, pelo envolvimento e pela ajuda nas mais diversas situações vividas.

Obrigada!

“(...) e, se clamares por inteligência, e por entendimento alçares a voz, se buscares a sabedoria como a prata e como tesouros escondidos a procurares, então, entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus.” Pv. 2:3-5

RESUMO

As xilanases hidrolisam aleatoriamente ligações β -1,4-glicosídicas da xilana, produzindo xilooligomêros de diferentes tamanhos; por esta razão, essas enzimas podem ser utilizadas na dieta de animais monogástricos para hidrolisar os polissacarídeos não-amiláceos como β -glucanos e arabinoxilanos encontrados em cereais, melhorando a conversão alimentar e o ganho de peso, por diminuírem o efeito anti-nutricional causado pela xilana. De todas as fontes de xilanases, os fungos filamentosos são interessantes do ponto de vista industrial, pelo fato de terem alta produção de enzimas quando comparados a outros micro-organismos em processos fermentativos. O custo de produção da enzima concentra-se, principalmente, nos processos pós-fermentativos na tentativa de se obter a enzima pura. A fermentação extrativa diminui o custo pela redução nas etapas de purificação da molécula. Objetivou-se com este trabalho produzir xilanase por fermentação extrativa em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) por *Aspergillus tamarii* URM 4634, escalonar a produção em biorreatores, caracterizar parcialmente a enzima e avaliar a influência da sua atividade na digestão monogástrica. A xilanase produzida teve melhor desempenho em pH ácido (3,6) e a 90 °C, demonstrando ser estável ao pH e à temperatura, mantendo sua atividade acima dos 40 e 50%, respectivamente, nos 180 minutos de ensaio. A maioria dos íons e substâncias inibidoras testadas não alterou significativamente sua atividade. A xilanase tem grande potencial para ser aplicada na indústria de rações por suas características e principalmente por ter comportado positivamente na simulação da digestão gástrica.

Palavras-chave: Fermentação extrativa, SDFA, xilana e suplementação enzimática.

ABSTRACT

The xylanases randomly hydrolyzes β -1,4-glycosidic bonds of xylan, producing xylooligomers of different sizes, therefore, these enzymes can be used in the diet of monogastric animals to hydrolyze the non-starch polysaccharides like β -glucans and arabinoxylans found in cereals, improving feed conversion and weight gain by decreasing the anti-nutritional effects caused by xylan. All sources of xylanase, filamentous fungi are interesting from the industrial viewpoint, because they have a high enzyme production when compared to other micro-organisms in fermentation processes. The production cost of the enzyme is concentrated mainly in the post-fermentation processes in an attempt to obtain pure enzyme. The application of extractive fermentation decreases cost by the reduction in purification steps of the molecule. The objective of this work by producing xylanase in ATPS extractive fermentation by *Aspergillus tamarii* URM 4634, scale production in bioreactors, the enzyme partially characterize and evaluate the influence of their activity in monogastric digestion. The xylanase had a better performance at acidic pH (3.6) and 90 ° C, proving to be stable to pH and temperature, maintaining its activity above 40 and 50% respectively, for 180 minute test. Most ions and inhibitors tested did not significantly alter its activity. The xylanase has great potential to be applied in the feed industry for its features and especially for having behaved positively in simulated gastric digestion.

Keywords: Extractive fermentation, ATPS, xylan and enzyme supplementation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Xilana	15
2.2. Xilanase	20
2.3. Aplicação das xilanases na indústria	23
2.4. Xilanases na indústria de rações	25
2.5. Purificação de proteínas E Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA).....	28
2.6. Polietilenoglicol	35
2.7. Fatores que influenciam no sistema de duas fases aquosas	36
2.8. Fermentação extrativa	39
2.9. Gênero <i>Aspergillus</i> e Produção de xilanase.....	41
3. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO.....	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPITULO I	59
RESUMO	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAIS E MÉTODOS	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO.....	76
AGRADECIMENTOS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura da Parede Celular Vegetal	16
Figura 2. Estrutura química da xilana	17
Figura 3. Representação da estrutura química da xilana	18
Figura 4. Representação da estrutura xilanases	21
Figura 5. Sítio de ligação entre a proteína contendo histidina e o PEG-IDA-Cu ²⁺ .SDFA	30
Figura 6. Diagrama de fases para sistemas aquosos bifásicos	33
Figura 7. Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos extracelulares	40

CAPITULO I

Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável resposta o rendimento da fermentação.....	92
Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável resposta o rendimento da fermentação.....	92
Figura 3. Curva de rendimento da fermentação ao longo do tempo	93
Figura 4. Curva dos coeficientes de partição das proteínas e da xilanase produzida por <i>Aspergillus tamaritii</i> URM 4634	93
Figura 5. Curva de pH ótimo da xilanase produzida por <i>Aspergillus tamaritii</i> URM 4634	94
Figura 6. Curva de estabilidade ao pH da xilanase produzida por	

<i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634 após 180 minutos de ensaio	94
Figura 7. Curva de temperatura ótima da xilanase produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634	95
Figura 8. Curva de estabilidade à temperatura da xilanase produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634 após 180 minutos de ensaio	95
Figura 9. (A) Perfil eletroforético da enzima produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634 presente na fase sal da fermentação extrativa. (B) Atividade xilanásica demonstrada no zimograma	96

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Publicações recentes de valores do conteúdo de xilana em amostras de madeira e métodos de pré-tratamentos aplicados	19
Tabela 2. Enzimas utilizadas em rações e seu modo de ação	26
Tabela 3. Sistemas de duas fases aquosas	32

CAPITULO I

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^4 da fermentação em SDFA (PEG/citrato)	87
Tabela 2. Resultados do planejamento fatorial 2^4 da xilanase produzida por <i>Aspergillus tamari</i> URM4634	88
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para a fermentação extrativa em SDFA (PEG/citrato)	89
Tabela 4. Inibição da xilanase na presença de íons metálicos e substâncias inibidoras	90
Tabela 5. Simulação <i>in vitro</i> da Digestão monogástrica	91

1. INTRODUÇÃO

A parede celular das plantas é constituída por três componentes principais: a celulose, a hemicelulose e a lignina (SANDRIM, 2003). Destes, a hemicelulose é o polissacarídeo não celulósico mais abundante encontrado na natureza e está disposto entre a celulose e a lignina; é constituída por polímeros lineares ou ramificados, contendo de dois a seis diferentes açúcares ou seus derivados (MOORE-LANDECKER, 1996).

Por esta razão, a hemicelulose não é quimicamente homogênea e dentre seus componentes o principal é a xilana (BAE et al., 2008). Esta representa um recurso significativo de biomassa renovável, compreendendo até 35% do peso seco da madeira e de resíduos agrícolas e aproximadamente um terço de todo o carbono orgânico renovável na terra (PRADE, 1995).

Esses polissacarídeos constituintes da parede celular dos vegetais, incluindo a xilana, não podem ser digeridos por animais monogástricos, devido à natureza de suas ligações, sendo resistentes à hidrólise no trato digestivo. A dificuldade na digestão da fibra, além de reduzir a energia do alimento, pode prejudicar a utilização de todos os outros nutrientes. Isto ocorre principalmente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, ou seja, tem grande capacidade de absorver água e formar substância gelatinosa no trato intestinal formando uma capa protetora que impede a absorção de outros nutrientes que se encontram disponíveis (CONTE et al., 2003).

Em contrapartida, para que seja totalmente degradada, a xilana deve sofrer ação de enzimas envolvidas no complexo xilanolítico, dentre elas as xilanases (endo-1,4- β -xilanase) e as β -xilosidases (β -D-xilosido-xylohydrolase) são as mais importantes (GHOSH et al., 1993; BAE et al., 2008). A função dessas enzimas quando adicionadas na alimentação é, além de atuar diminuindo a viscosidade, melhorar a energia metabolizável dos alimentos, pois aumenta a disponibilidade dos nutrientes presentes no alimento digerido. Estas enzimas podem ser adicionadas aos alimentos que possuem altas quantidades de polissacarídeos não-amiláceos (CONTE et al., 2002).

As xilanases podem ser encontradas em plantas, algas, insetos, protozoários, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dentre as fontes microbianas citadas, os

fungos filamentosos são conhecidos como secretores de alto nível de xilanase, o que faz destes micro-organismos efetivos produtores da enzima, sendo amplamente utilizados em várias aplicações industriais (POLIZELI et al., 2005), com destaque para o gênero *Aspergillus*, que é um dos gêneros mais utilizados na produção industrial de enzimas como xilanases (RIZZATTI et al., 2004).

As muitas possibilidades de aplicações das xilanases exige uma busca de novas enzimas e novos micro-organismos produtores com atividades específicas maiores, maior produtividade e rendimento (USTINOV et al., 2008) aliado a um processo de produção de baixo custo e que possibilite a diminuição de etapas no processo de purificação da enzima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Xilana

A parede celular dos vegetais é constituída basicamente por celulose, pectina, lignina e um grupo variado de polissacarídeos denominados hemiceluloses (Figura 1). Esses se caracterizam por serem insolúveis em água, mas miscíveis em soluções alcalinas. Schulze (1891) foi o primeiro a usar o termo hemicelulose para definir esses compostos e esta atribuição foi devido a forte associação deles com a celulose (WHISTLER; SMART, 1953).

Devido à associação com as fibras de celulose, as hemiceluloses são responsáveis pela rigidez do tecido vegetal, já a lignina está mais relacionada com a formação de canais de água e confere resistência mecânica, química e biológica à planta. De acordo com os modelos mais recentes, as hemiceluloses podem servir nesta matriz como pontes flexíveis e agir como uma malha que envolve as fibras de celulose (RAMOS, 2003; SAHA, 2003; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Sabe-se que na sua maioria, a hemicelulose é formada por heteropolissacarídeos constituídos por unidades repetidas de: pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (principalmente D-galactose, D-glicose e D-manose) e ácidos urônicos (WHISTLER; RICHARDS, 1970). Contudo, existem evidências de que o número de polissacarídeos diferentes, caracterizados como hemicelulose nas

espécies vegetais, não excede a quatro e dentre eles, as xilanas são frequentemente encontradas como os principais constituintes (WHISTLER; SMART, 1953; REICHER; CORRÊA; GORIN, 1984).

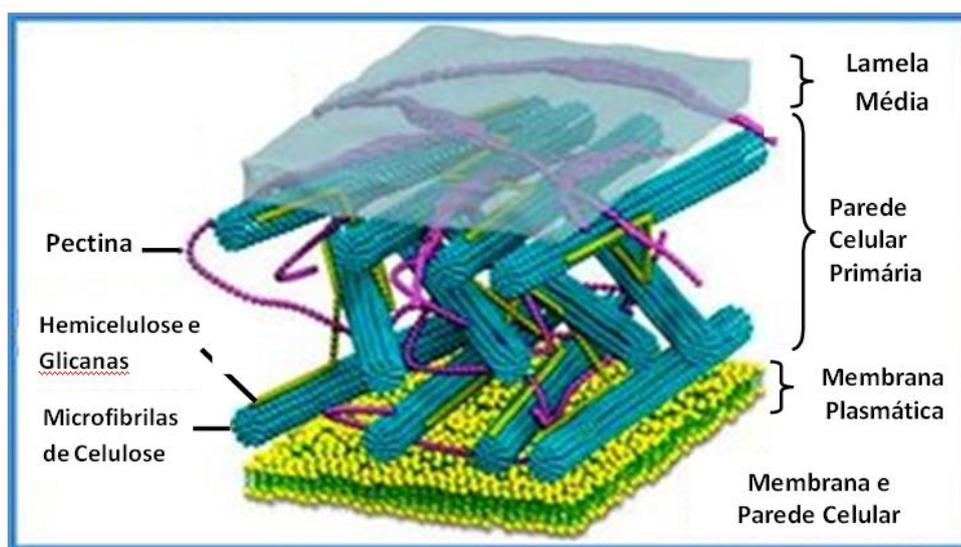


Figura 1. Estrutura da Parede Celular Vegetal.

Fonte: <http://acbarroso60.wordpress.com/2011/03/02/botanica-plantas/modificado>

A xilana é encontrada em grandes quantidades em madeiras de angiospermas (15-30% do teor da parede celular) e de gimnospermas resinosas (7-10%), bem como em plantas anuais (<30%) (Figura 2) (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003). Trata-se de um heteropolissacarídeo que tem sua cadeia principal formada por unidades de D-xilose e cadeias secundárias de L-arabinofuranoses ligadas à posição O-3 da D-xilose. Além disso, a xilana possui resíduos de Ácido-O-2-metil-D-glucurônico ligados à posição O-2, sendo alguns resíduos de D-xilose acetilados (YANG et al., 2005).

Porém, devido às variações existentes entre as espécies vegetais a estrutura da xilana pode variar, portanto, as unidades de xilose da cadeia principal com ligações β -(1-4) podem ser substituídas por grupos O-acetila nas posições O-2 e/ou O-3 ramificado (1 a 3 unidades por ramo) com L-arabinofuranose (arabinoxilanos), ou resíduos de ácido D-glucurônico, que podem ser ainda mais O-acetilados ou O-

metilados na posição C-4. Outros componentes menores conhecidos como anexos à cadeia principal da xilana é a D-galactose e radicais de ácido ferúlico ligados a L-arabinose (EBRINGEROVA, 2006; MOSIER et al., 2005; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

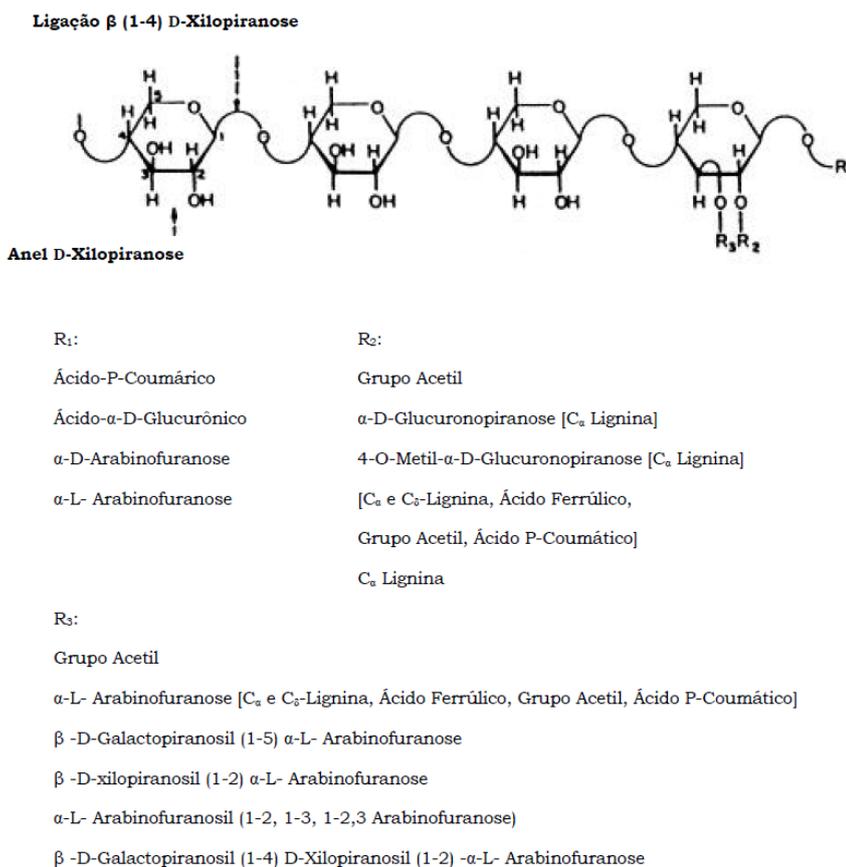


Figura 2. Estrutura química da xilana. Fonte: Betini (2006).

Na figura 3, estão representadas estruturas químicas de diferentes xilanas a depender de suas origens (grama, cereais e madeiras) e na tabela 1 estão dispostas xilanas de diversas fontes que têm sido investigadas recentemente, o conteúdo de xilana contido e o pré-tratamento para sua extração. Essas biomacromoléculas possuem uma massa molar relativamente alta de 10 – 40 kDa, um grau de polimerização de 100-200 unidades e são encontradas principalmente nas camadas primária e secundária da parede celular vegetal (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

Existem evidências de que as arabinoxilanas (xilanas que possuem grande número de L-arabinofuranoses em cadeias laterais), contidas nos grãos de cereais, encontram-se interligadas na parede celular através de ligações cruzadas ocorridas por esterificação com o ácido diferrúlico (Figura 2), e/ou pela formação de complexos com proteínas (HOSENEY; FAUBION,1981) o que dificulta a extração e purificação das xilanas, como também a digestão dos grãos de cereais principalmente por animais monogástricos (SAULNIER et al., 1995).

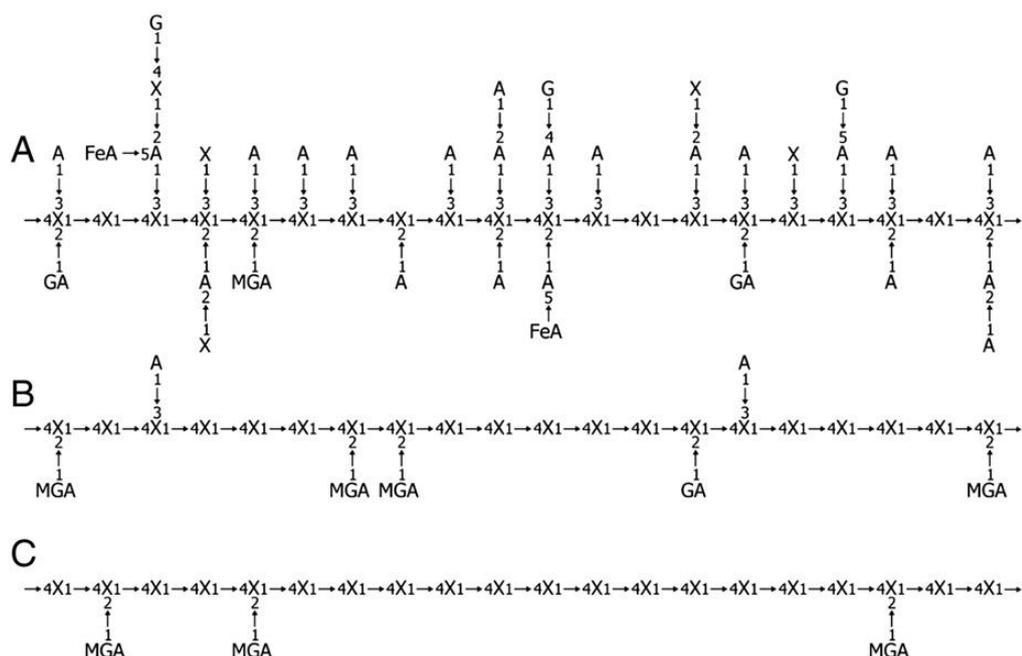


Figura 3. Representação da estrutura química da xilana: A) Gramíneas e cereais, B) Madeira macia e C) Madeira rígida. (X- xilose, A- arabinose, G - galactose, GA –ácido glicurônico MGA - 4-O-metil-ácido glicurônico, FeA — ácido felúrico). Fonte: Deutschmann; Dekker (2012).

O acesso físico às ligações xilanosídicas é restringido pelos componentes lignocelulósicos circundantes, assim, as matérias-primas com alto conteúdo de xilana devem ser pré-tratadas antes da degradação enzimática (DEKKER, 1985). Para tal, existem vários métodos de que podem expor os componentes polissacarídicos para a hidrólise enzimática (Tabela 1), incluindo a extração de alta concentração alcalina (KUSAKABE; YASUI; KOBAYASHI, 1976a), tratamento de baixa concentração alcalina (KUSAKABE; YASUI; KOBAYASHI, 1976b) pré-tratamento ácido (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996) e aquecimento (cozedura)

(SASAKA; OZER, 1995). Alguns destes métodos são utilizados com sucesso na produção de derivados da xilana como a xilose.

Tabela 1. Publicações recentes de valores do conteúdo de xilana em amostras de madeira e métodos de pré-tratamentos aplicados.

Origem	Conteúdo de xilana (matéria seca %)	Pré-tratamento aplicado/extração da xilana				Referência
		Alcalino	Ácido	Água aquecida	Outros	
<i>Acacia dealbata</i>	16,4			+		Yanez et al. (2009a)
<i>Aspen</i> sp.	16,5	NaOH				Liu et al. (2011)
<i>Aspen (Populus tremuloides)</i>	17,7	NaOH		+		Al-Dajani; Tschirner (2010)
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	19,9			+		Lopez et al. (2010a)
<i>Eucalyptus globulus</i>	16,6			+		Garrote et al. (2007)
	18,0			+		Lopez et al. (2010a)
<i>Leucaena diversifolia</i>	15,7			+		Lopez et al. (2010a)
<i>Leucaena leucocephala</i>	17,1			+		Feria et al. (2011)
<i>Paulownia fortunei</i>	18,3			+		Lopez et al. (2010a)
<i>Poplar</i> sp.	12,0				Líquido iônico	Samayam; Schall (2010)
<i>Poplar (Populus nigra x Populus maximowiczii)</i>	14,85	Cal				Sierra et al. (2009)
<i>Poplar</i> sp.	14,9	ExFA ^a				Balan et al. (2009)
<i>Poplar</i> sp.	14,9	NH ₄ OH				Gupta; Lee (2009)
<i>Poplar (Populus nigra x Populus maximowiczii)</i>	14,9		Vapor+SO ₃			Bura et al. (2009)
<i>Poplar (Populus nigra x Populus maximowiczii)</i>	14,9	Cal				Sierra et al. (2011)
	17,8	Cal				Sierra et al. (2011)
<i>Sesbania grandiflora</i>	16,3			+		Yanez et al. (2009b)
<i>Willow (Salix schwerinii x Salix viminalis)</i>	15,0		Vapor+SO ₃			Sassner et al. (2008)

^a Explosão de Fibra de Amônia (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

No entanto, a extração alcalina e o pré-tratamento ácido não são adequados para a produção de xilo-oligossacarídeos porque causam sérios problemas de poluição e produzem grande quantidade de xilose no hidrolisado, o que não é desejável (YANG et al., 2005).

As aplicações industriais mais importantes das xilanas encontram-se na produção do furfural (MC KILLIP; SHERMAN; KIRK-OTHMER, 1980) e do papel (WHISTLER; SMART, 1953), onde elas são processadas sob a forma bruta. A presença de cerca de 5% de hemicelulose na polpa da madeira resulta em um papel de melhor qualidade, com maior resistência mecânica. Em produtos alimentícios, sabe-se que as xilanas presentes nas farinhas de trigo apresentam grande importância no cozimento e maciez das massas, devido à capacidade que possuem de reter água (JELACA; HLYNKA, 1971; JELACA; HLYNKA, 1972) e que reduzem significativamente o envelhecimento do produto, por interações específicas com o amido (KIM; D'APPOLONIA, 1977). Outras possíveis aplicações estão ligadas a utilização da xilana como carreadora de medicamentos, na produção de material para curativos e como aditivos na fabricação de papel (EBRINGEROVA, 2006).

A nível de pesquisa, a xilana tem sendo muito estudada ao longo dos anos e extensivamente empregada para a produção industrial de bioetanol e outros produtos a partir de fermentações; na produção de xilo-oligossacarídeos utilizados como prebióticos; de filmes para embalagens comerciais; de espumas porosas e géis formados a partir de ligações cruzadas entre as xilanas; dentre outros (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

Além disso, as xilanas têm sido consideradas como um dos recursos renováveis mais importantes e ganha cada vez mais importância como base para produção de novos biopolímeros e polímeros funcionais através de reações de modificação química (HEINZE; KOSCHELLA; EBRINGEROVA, 2004; LINDBLAD; ALBERTSSON, 2004).

Porém, um problema que limita a utilização industrial de xilanas é a sua pouca solubilidade em água ou em sistemas aquosos a pH neutro. Como alternativa; para obter os seus derivados solúveis, processos de esterificação, em particular de metilação, de hidroxialquilação e de carboximetilação dos grupos hidroxila são recomendados (PETZOLD et al., 2006).

2.2 Xilanases

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações

químicas no organismo, sem serem alteradas neste processo (CHAMPE; HARVEY, 1989).

De acordo com Nelson e Cox (2006), todas as enzimas possuem as seguintes características: não apresentam modificações ao final da reação, atuam em quantidades muito pequenas e aceleram a velocidade da reação sem modificar a posição de equilíbrio de uma reação reversível. Devido a essas características, elas podem ser empregadas em diferentes processos e são muito aplicadas nas indústrias, mas; para que seja avaliado esse potencial se faz necessária a caracterização das enzimas a fim de se conhecer suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001).

Dentre as várias enzimas existentes, as xilanases (Figura 4) são glicosidases (O-glicosídeo hidrolases, CE 3.2.1.x) que catalisam a hidrólise da xilana. São um grupo generalizado de enzimas que estão envolvidas na produção de xilose, fonte primária de carbono para o metabolismo celular e que são produzidas por uma multiplicidade de organismos, incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes (PRADE, 1995).

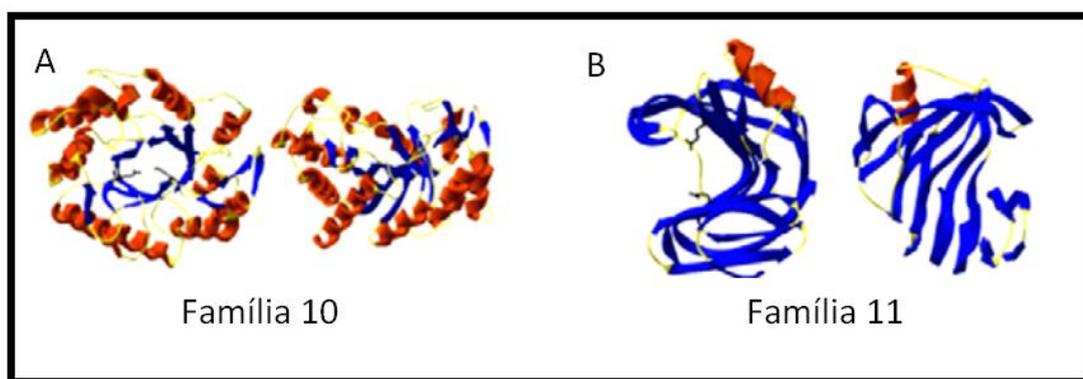


Figura 4. Representação da estrutura xilanases: (A) Xilanase produzida por *Streptomyces lividans*; família 10 das hidrolases; (B) Xilanase produzida por *Trichoderma reesei*, família 11 das hidrolases. Fonte: Collins et al. (2005).

As xilanases foram relatadas pela primeira vez em 1955 por Whistler e Masek, sendo originalmente denominadas de pentosanases e foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em 1961, quando a elas foi atribuído o código EC 3.2.1.8. O seu nome oficial é endo-1,4- β -xilanase, mas comumente são utilizados outros termos que incluem xilanase, endoxilanase, 1,4- β -D-xilana-xilanohidrolase, endo-1,4-di- β -D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanase (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Devido à heterogeneidade e complexidade do substrato da xilanase, a hidrólise completa da xilana requer uma grande variedade de enzimas que agem conjuntamente. Nesse sentido, as endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) clivam aleatoriamente a cadeia principal da xilana, já as β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) clivam os monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora dos xilo-oligossacarídeos e da xilobiose, ao passo que a remoção dos grupos ramificados da cadeia principal é catalisada pelas enzimas α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetilxilanesterases (EC 3.1.1.72), esterases do ácido ferúlico (CE 3.1.1.73) e esterases do ácido p-cumárico (EC 3.1.1) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Como consequência dessa grande variedade de xilanases, essas enzimas fazem parte das famílias 10 e 11 das glicosil-hidrolases, baseado em seus domínios catalíticos, sua estrutura primária e similaridades na sequência de aminoácidos (SHALLOM; SHOHAM, 2003; SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003). A maioria das xilanases da família 10 são endo-1,4- β -xilanases, que possuem peso molecular elevado (>30 kDa) e ponto isoelétrico baixo. As pertencentes à família 11 são, principalmente, xilanases com um elevado ponto isoelétrico e baixo peso molecular (<30 kDa) (WONG; TAN; SADDLER, 1988; HENRISSAT; BAIROCH, 1986; HENRISSAT; DAVIES, 1997). No entanto, várias exceções a esse padrão têm sido encontradas, a exemplo, aproximadamente 30% das xilanases identificadas recentemente, em particular as xilanases fúngicas não podem ser classificadas por este sistema (MATTE; FORSBERG, 1992; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

O sistema enzimático xilanolítico completo, incluindo todas as atividades acima citadas, já foi encontrado em fungos (BELANCIC, 1995; SUNNA;

ANTRANIKIAN, 1997), actinomicetos (ELEGIR; SZAKACS; JEFFRIES, 1994) e bactérias (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997), sendo *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaete*, *Chytridiomyces*, *Ruminococci*, *Fibrobacteres*, *Clostridium* e bacilos os principais produtores, destacando-se espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* na produção industrial (MATTE; FORSBERG, 1992; WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002). Os nichos ecológicos desses micro-organismos são diversos e, normalmente, incluem ambientes onde se acumula material vegetal em deterioração, bem como no rúmen de animais poligástricos onde se encontram bactérias e fungos capazes de degradar as fibras presentes na parede celular dos vegetais (PRADE, 1995; SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; KRAUSE et al., 2003; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; FENGXIA et al., 2008).

A maior parte da xilanase comercial é produzida por micro-organismos em processos fermentativos. Porém, o custo de produção é o principal fator que restringe a utilização da xilanase, indicando a necessidade de um sistema de baixo custo de produção para o mercado desta enzima (FOYE et al., 2005).

2.3 Aplicação das xilanases na indústria

A degradação da parede polissacarídica de plantas tem grande importância nas indústrias de bebidas, alimentícia, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, entre outras. A hidrólise enzimática de polímeros de plantas vem se tornando uma alternativa ecologicamente correta que pode substituir o uso de substâncias químicas em diversos processos nas indústrias (BETINI, 2006).

A hidrólise enzimática da xilana permite sua utilização como uma fonte de energia na alimentação animal ou nos diferentes processos biotecnológicos (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; SUBRAMANYAN; PREMA, 2002). Essa hidrólise parcial altera as propriedades físicas e químicas da xilana, que resulta num aumento da qualidade de produtos que contém este polissacarídeo (FENGXIA, et al., 2008).

Neste contexto, o interesse na aplicação de xilanases na indústria tem aumentado, devido a sua importância na indústria do papel, em rações para animais e na indústria de pães (BLANCO et al., 1995).

Durante os últimos anos, as aplicações das xilanases voltaram-se particularmente para a indústria de papel e celulose. No entanto, as xilanases desempenham papel importante na extração de café, óleos vegetais, amido, flavorizantes e pigmentos; para liquefazer frutas e vegetais; na fermentação da cerveja para evitar problemas na filtração e na turvação; nas indústrias de panificação e forragem; na clarificação de vinhos e sucos; no pré-tratamento da forragem para melhorar a digestibilidade do alimento dos ruminantes e para facilitar a compostagem. As xilanases em sinergismo com várias outras enzimas tais como mananases, ligninases, xilosidades, glucanases, glucosidades, podem ser utilizadas para a geração de combustíveis biológicos, tal como etanol e xilitol, a partir de biomassas lignocelulósicas (OLIVEIRA, 2003).

Mais especificamente, na indústria de celulose e do papel, as xilanases são empregadas no processo de pré-branqueamento a fim de reduzir o uso de produtos químicos como o cloro (BAJPAI, 1999), além de resultar num produto mais brilhante do que poderia ser alcançado sem o tratamento enzimático (NINAWA; KUHAD, 2006). Na indústria de alimentos para animais, xilanases são utilizadas para aumentar o ganho de peso corporal (SILVERSIDES; BEDFORD, 1999; KUNG et al., 2000). Na indústria da panificação, são utilizadas para diminuir a viscosidade da massa, aumentando o volume do pão e a vida de prateleira (FIGUEROA-ESPINOZA, 2004). Também, podem ser aplicadas para a clarificação de vinhos e sucos (BIELY, 1985; SILVA; FRANCO; GOMES, 1996).

Na alimentação animal, os polissacarídeos não amiláceos, principais constituintes da parede celular dos alimentos de origem vegetal, não podem ser digeridos por animais monogástricos, devido à natureza de suas ligações, sendo resistentes à hidrólise no trato digestivo. A dificuldade na digestão da fibra que reduz a energia do alimento também pode prejudicar a utilização de outros nutrientes e isto ocorre mais frequentemente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, ou seja, tem grande capacidade de absorver água e formar substância gelatinosa no trato intestinal (CONTE et al., 2003).

A viscosidade da digesta, fator esse considerado antinutricional, reduz a disponibilidade de todos os nutrientes, e pode ser contornada através da adição da enzima xilanase na composição da dieta, visando à utilização de alimentos que possuam altas quantidades de polissacarídeos não-amiláceos. A função dessas enzimas além de diminuir a viscosidade, seria melhorar a energia metabolizável dos alimentos (CONTE et al., 2002).

Embora sejam muitas as possibilidades de aplicação das xilanases, sua aplicação prática torna-se limitada, devido à estabilidade relativamente baixa e alteração nas atividades catalíticas sob condições utilizadas em processos industriais, tais como: temperaturas elevadas, níveis extremos de pH ou de solventes não aquosos. A aplicação industrial requer propriedades específicas dos biocatalisadores, desta forma, ainda existe um interesse em encontrar novas xilanases com aplicações inovadoras. Especialmente as xilanases termoestáveis podem ser utilizadas em aplicações nas quais a diminuição da temperatura diminui o custo do processo, tornando-se mais econômico, ou em que as temperaturas elevadas fossem necessárias para aumentar a biodisponibilidade e/ou a solubilidade do substrato, para reduzir a viscosidade bem como o risco de contaminação. Enzimas acidófilas e alcalifílicas seriam obviamente benéficas aos processos em que as condições de pH extremos são necessários (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

2.4. Xilanases na indústria de rações

Alguns alimentos de origem vegetal possuem fatores considerados antinutricionais que limitam seu uso como componentes em rações para animais. Existem enzimas que agem na composição desses alimentos e são utilizadas como aditivos nas rações, sendo uma estratégia interessante para a melhor utilização dos nutrientes. A utilização desses aditivos alimentares tem como objetivo melhorar a eficiência de produção dos animais pelo aumento da digestão de produtos de baixa qualidade e redução na perda de nutrientes nas fezes, sendo possível baixar os níveis nutricionais da dieta com possíveis vantagens econômicas (SENS, 2009).

Para Guenter (2012) as principais finalidades da suplementação enzimática em rações são: remover ou destruir os fatores anti-nutricionais dos alimentos, aumentar a digestibilidade total da ração, potencializar a ação das enzimas endógenas, diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes; além de trazer melhorias no desempenho animal e, conseqüentemente, uma maior rentabilidade na criação (COUSINS, 1999).

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações para animais monogástricos podem se dividir em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, lipases, etc.) e enzimas que esses animais não podem sintetizar (β -glucanases, pentosanases e α -galactosidades), pois o código genético dos monogástricos não dispõe da indicação para sua síntese (HENN, 2002).

Segundo Zanella (2001), existem três grupos de enzimas disponíveis no mercado: (1) enzimas destinadas a alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja); (2) enzimas destinadas a alimentos com alta viscosidade (trigo, aveia, cevada, farelo de arroz); (3) enzimas destinadas a degradar o ácido fítico dos grãos vegetais.

A Tabela 2 apresenta as principais enzimas utilizadas nas rações, seus substratos e seus principais efeitos.

Tabela 2. Enzimas utilizadas em rações e seu modo de ação.

Enzima	Substrato	Efeitos
Xilanase	Arabinoxilanos	Redução da viscosidade da digesta.
Glucanases	β -Glucanos	Redução da viscosidade da digesta. Diminuição na umidade da cama.
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta.
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes
Galactosidades	Galactosídios	Remoção de galactosídios
Fitases	Ácido Fítico	Melhor utilização do fósforo dos vegetais. Remoção do ácido fítico.
Proteases	Proteínas	Suplementação de enzimas endógenas. Degradação mais eficiente da proteína.
Amilases	Amido	Suplementação de enzimas endógenas. Degradação mais eficiente do amido.
Lipases	Lipídios e Ácidos Graxos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais.

Fonte: SENS (2009)

Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas, auxiliam no processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta. A enzima adicionada ao alimento seco só é ativada no trato digestivo quando misturada aos fluídos digestivos e sob a temperatura corporal (SENS, 2009).

As enzimas utilizadas na alimentação de não-ruminantes devem resistir e conservar atividade considerável depois dos processos de fabricação e digestão. Os fatores que podem influenciar sua estabilidade, entre outros, são: a origem, o tipo de atividade, a composição da dieta, a condição de processamento (temperatura), o armazenamento, as condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (FRANCESCH, 1996).

Para Dourado (2008), as enzimas exógenas podem ser incorporadas nas formulações das dietas dos animais de duas formas. Uma aplicação mais prática, chamada “*on top*”, que consiste em suplementar com as enzimas uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais, com intuito de melhorar o desempenho. A segunda alternativa seria alterar a formulação da ração, reduzir os nutrientes e adicionar enzimas exógenas para restaurar o valor nutricional da dieta padrão, visando o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais normais, de forma mais econômica.

A utilização de enzimas na dieta pode ser feita quando se tem o objetivo de degradar determinado fator anti-nutricional que venha a reduzir o aproveitamento dos nutrientes da dieta pelo animal. Um dos fatores anti-nutricionais presentes na dieta de monogástricos são os polissacarídeos não-amiláceos.

Nos alimentos de origem vegetal, os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) são os principais constituintes da parede celular (CHOCT, 1997). A hemicelulose, a celulose, arabinose, xilana, manose, galactose, β -glucano, ácido urônico são exemplos de PNAs. Devido à natureza de suas ligações, os PNAs são resistentes a hidrólise no trato gastrointestinal dos animais monogástricos. Estes compostos não causam sintomas de toxicidade, mas apresentam propriedades anti-nutritivas que podem afetar o desempenho dos animais (LECZNIESKI, 2006).

Os PNAs atuam alterando a fisiologia e morfologia do trato gastrointestinal, causando efeitos indiretos e implicações na eficiência de utilização dos nutrientes,

podendo alterar também a microbiota intestinal (SENS, 2009). Wenk (2001) cita que em rações com maior quantidade de PNAs contém menor quantidade de energia metabolizável, e devido ao alongamento da parede estomacal causam uma sensação de saciedade antes de se alcançar o nível de ingestão deste nutriente em animais em crescimento, resultando em queda de consumo. O mesmo autor demonstrou os efeitos dos PNAs sobre o tempo de esvaziamento do trato digestivo.

Além de reduzir a energia metabolizável do alimento, os PNAs podem proporcionar uma menor utilização de outros nutrientes, como a absorção de minerais, pois vários autores relacionaram a presença destes compostos no alimento e a conseqüente formação de gel, como um dos fatores que afetam negativamente esta absorção (FIALHO, 1991; TEIXEIRA, 1994; DOMENE, 1996; SENS, 2009).

Alguns estudos relatam o aumento da disponibilidade de nutrientes e do crescimento de suínos alimentados com dietas contendo xilanase ou β -glucanase (ADEOLA; COWIESON, 2011).

2.5 Purificação de proteínas e Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Desde 1980, os processos biotecnológicos têm crescido e se tornado cada vez mais importantes ao oferecer numerosas vantagens sobre a síntese química. No entanto, a separação dos produtos obtidos por estes processos pode ser limitada devido a natureza das biomoléculas produzidas, geralmente complexas e sensíveis ao pH, temperatura e concentração do substrato ao longo do processo. Além disso, elas são produzidas juntamente a outras de menor interesse e em meios que as tornam diluídas (WETHEARLY, 1994). Essas limitações tornam o processo de separação oneroso por serem necessárias muitas etapas até que se tenha a molécula pura.

Por isso, o desenvolvimento de técnicas e métodos para separação e purificação de proteínas é um importante pré-requisito para a maioria dos avanços nas indústrias de biotecnologia (COSTA et al., 2000), que buscam produções em larga escala eficientes, que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula e diminuindo o custo da purificação que pode

atingir até 90% do custo total de produção. Uma técnica de extração e purificação que se enquadra nestes critérios e que já vem sendo utilizada industrialmente envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (DIAMOND; HSU, 1992; DYR; SUTTNER, 1997).

Também conhecida por extração líquido-líquido, é uma tecnologia versátil e muito útil na separação de compostos, tais como produtos químicos, biomoléculas e nanopartículas. O processo de partição é motivado pelas interações hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema com o produto a ser extraído (FRANK et al., 2008).

As principais vantagens deste tipo de extração são: a facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos de baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de operação rápida e seletiva; possibilidade de operação à temperatura ambiente e mais econômico que outros processos de separação (ALBERTSSON, 1986).

Os primeiros sistemas PEG/sais a serem utilizados pela indústria preparadora de enzimas foram os constituídos de PEG/fosfato (KULA, 1982). Mas, tentando-se minimizar a poluição ambiental, diferentes maneiras de reciclar os sais foram desenvolvidas e além do fosfato, outros sais começaram a ser empregados em SDFAs, como sulfatos e citratos. Polímeros neutros ou carregados (ex.: dextrana) formam duas fases com polietilenoglicol, sendo esses sistemas extensivamente utilizados em purificação e extração de biomateriais (FRANCO et al., 1996).

Nesse sentido, as indústrias têm empregado o SDA para o isolamento de enzimas a partir da sua fonte natural ou de seu extrato bruto ou cru, sendo formados pela mistura de dois polímeros de cadeias flexíveis em água ou de um polímero e um sal em certas concentrações, com variações do sistema convencional – PEG/dextrana/água e PEG/sal/água (ROSA et al., 2010; ASENJO; ANDREWS, 2011). As proteínas são particionadas para uma das duas fases de acordo com suas características físico-químicas, com um coeficiente de partição que pode ser modificado através da alteração das condições experimentais do meio (SPELZINI et al., 2008; BASSANI et al., 2010).

São diversas as variáveis que influenciam na formação das fases e na partição das biomoléculas nesses sistemas e elas podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (componentes do sistema, massa molar do

polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína-alvo (hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) quanto a partição das biomoléculas (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO; NERLI; PICÓ, 2004).

O fato da partição depender de um grande número de variáveis distintas confere considerável versatilidade aos sistemas de duas fases aquosas na separação de misturas de componentes. Entretanto, a existência de tantas variáveis, a sua grande maioria interdependentes, torna extremamente difícil a previsão teórica do coeficiente de partição de um dado soluto, obrigando por vezes a um trabalho experimental exaustivo (KULA et al., 1982, PORTO, 2004).

Um método potencialmente útil para extração líquido-líquido na indústria de proteínas é a utilização de metais como ligantes em SDFA, por aumentar a seletividade da partição dessas proteínas (SUH; ARNOLD, 1990; BIRKENMEIER et al., 1991). Esse processo fundamenta-se na combinação da propriedade de reconhecimento de biomoléculas pelo ligante e sua partição no SDFA. O ligante é acoplado covalentemente à fase rica em polímero, portanto sua partição ocorre em direção à fase superior que é a de menor densidade. Se a biomolécula a ser isolada tiver afinidade pelo ligante, a formação do complexo ligante-biomolécula (Figura 5) induzirá a alteração do coeficiente de partição da proteína para aquela fase onde encontra-se o ligante (KOPPERSCHLÄGER, 1994).

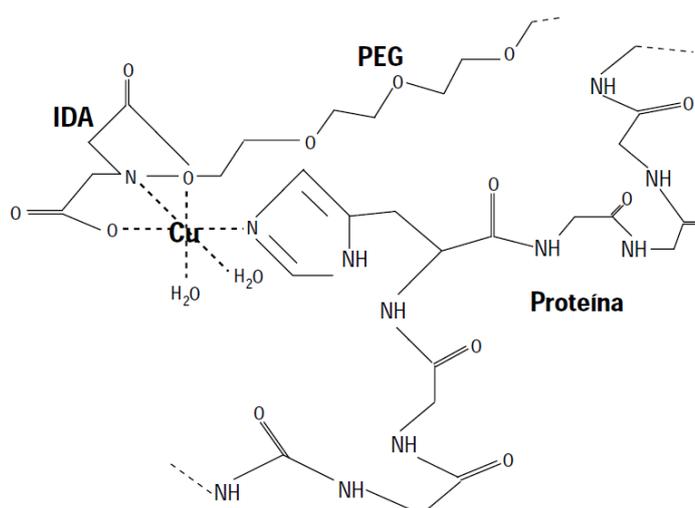


Figura 5. Sítio de ligação entre a proteína contendo histidina e o PEG-IDA-Cu²⁺ em SDFA. Fonte: Silva et al. (1999).

A utilização de ligantes indutores da partição apresenta algumas vantagens, tais como: os ligantes podem ser reciclados diversas vezes sem sofrer perda significativa do comportamento; pode-se utilizar elevada concentração de metal imobilizado o que resulta em elevada capacidade de “atração” da proteína; relativa facilidade de desacoplamento da proteína e regeneração do ligante e baixo custo dos metais (ARNOLD, 1991).

O SDFA ainda tem sido utilizado como primeiro passo da purificação, com a finalidade de remover grandes quantidades de diferentes contaminantes por uma operação relativamente simples e econômica, mesmo apresentando diversas vantagens em relação aos métodos convencionais para o isolamento e purificação de proteínas: o equilíbrio de partição é atingido rapidamente, pode ser aplicado em escalas maiores como piloto e industrial, possibilita o funcionamento contínuo, tem baixos custos, os materiais que formam o sistema são baratos e podem ser reciclados (RODRIGUEZ-DURÁN et al., 2013).

Além disso, outra vantagem dos sistemas de duas fases aquosas é a elevada concentração de água utilizada (cerca de 85-99%), o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares sem desnaturá-las. As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações, que de outro modo seriam difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas (VENÂNCIO, 1996; GAVASANE; GAIKAR, 2003).

Mas, as aplicações dos SDFA são em geral limitadas devido ao equilíbrio ideal de fases, da seletividade do sistema e da partição de proteínas (CUNHA, T.; AIRES-BARROS, 2002).

Para a formação das duas fases do sistema aquoso, uma ampla variedade de polímeros pode ser utilizada, sendo determinado pelo custo do polímero, o tempo de separação das fases, a concentração de polímero necessária para a formação das fases, a possibilidade de reutilização do polímero e o potencial tóxico são fatores de grande importância para a escolha do polímero (COSTA et al., 2000). Na tabela 3, estão classificados os SDFA em diferentes grupos de acordo com sua composição.

Tabela 3. Sistemas Líquidos de duas fases aquosas.

CLASSE 1: Polímero não iônico + Polímero não iônico + Água	
Polipropilenoglicol	Metoxipolietilenoglicol Álcool polivinílico Hidroxiopropil-dextrana Dextrana
Polietilenoglicol (PEG)	Álcool polivinílico Dextrana
Álcool polivinílico	Metilcelulose Hidroxiopropil-dextrana
Metilcelulose	Hidroxiopropil-dextrana Dextrana
Etilhidroxietilcelulose	Dextrana
CLASSE 2: Polieletrólito + Polímero não iônico + Água	
Sulfato de Dextrana de Sódio	Polipropilenoglicol Metoxi-PEG-NaCl PEG-NaCl Álcool Polivinílico-NaCl Dextrana-NaCl NaCl PEG-NaCl Álcool Polivinílico-NaCl Metilcelulose-NaCl Etilhidroetilcelulose-NaCl Hidroxiopropil-dextrana-NaCl
Carboximetilcelulose de polipropilenoglicol	Polipropilenoglicol + NaCl PEG + LiSO ₄ Metilcelulose Álcool Polivinílico
DEAE-dextrana-HCl	
CLASSE 3: Polieletrólito + Polieletrólito + Água	
Sulfato de dextrana de sódio	Carboximetildextrana de sódio
Sulfato de dextrana de sódio	Carboximetildextrana de sódio
Carboximetildextrana de sódio	Carboximetilcelulose
Sulfato de dextrana de sódio	DEAE dextrana - HCl - NaCl
CLASSE 4: Polímero + Composto de Baixa massa molar + Água	
Polipropilenoglicol	Fosfato de potássio Citrato de sódio
Metoxipropilenoglicol	Fosfato de potássio Citrato de sódio
PEG	Fosfato de potássio Citrato de sódio

Fonte: (ALBERTSSON, 1986)

Mesmo havendo muitas possibilidades na formação dos sistemas, o desenvolvimento de extrações líquido-líquido utilizando SDFA em grande escala está muito limitado aos sistemas de PEG-dextrana e PEG-sal. Estes possuem propriedades físicas favoráveis, especialmente no que se refere à viscosidade e a diferença de densidade entre as fases. Esta escolha é bastante influenciada também por questões legais a que os processos de produção têm que obedecer, tanto o PEG como a dextrana são substâncias atóxicas e não causam distúrbios ao ambiente (SARMENTO et al., 1994); os sistemas formados por PEG e sal também apresentam rápida separação de fases, baixo custo e, sobretudo, elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade (PADILHA et al., 2011).

O diagrama de fases, representado na Figura 6, pode ser dividido em duas regiões por uma linha convexa chamada binodal ou curva de equilíbrio. Sistemas cuja composição fica abaixo da curva binodal formam apenas uma fase, enquanto que os sistemas com composição situada acima da curva binodal formam duas fases homogêneas. (ALBERTSSON, 1986).

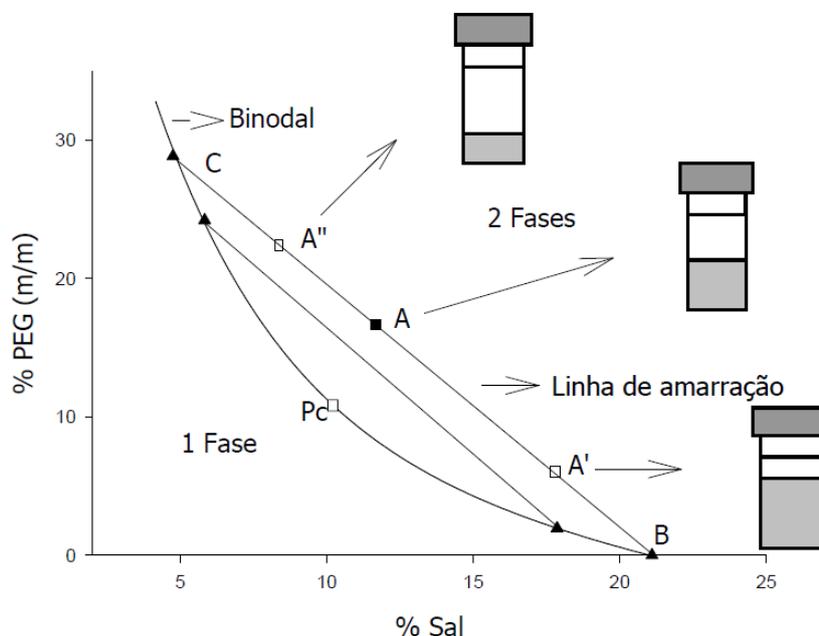


Figura 6. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos. Fonte: Costa, 2010.

Também estão representadas na figura 6 a linha de amarração que, para determinada composição global do sistema (ponto A), fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos C (fase superior) e B (fase inferior). Qualquer conjunto de pontos globais ou de mistura (A, A', A'') que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (composição, densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração (ZASLAVSKY, 1995, DA SILVA; LOH, 2006).

Outra particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (P_c) no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais. Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

As curvas binodais podem ser determinadas por três métodos diferentes. No primeiro, a determinação da composição das fases que formam o sistema é feita através da cromatografia líquida de alta eficiência. O segundo método baseia-se em um processo de titulação entre os componentes que formam os sistemas (PEG, sais e água). A grande vantagem deste sistema de titulação é a simplicidade e rapidez, porém como o método baseia-se na observação visual de mudança de fase tem-se um determinado grau de imprecisão quando as fases se alternam (VERNAU; KULA, 1990). O terceiro método que pode ser utilizado consiste na combinação entre os dois métodos citados anteriormente, baseando-se na preparação de vários sistemas de fases com composições diferentes. Em seguida, adiciona-se água em cada sistema sob agitação até as soluções tornarem-se transparentes. Finalmente determina-se a composição dos novos sistemas monofásicos e com isto obtêm-se os pontos da curva binodal (RIBEIRO, 2001).

Retornando ao SDFA e sua funcionalidade, tem-se visto que na prática, as ótimas condições para o rendimento e altos fatores de purificação têm sido obtidas para várias proteínas que foram estudadas. Isto é comumente feito seguindo estudos experimentais dos efeitos das variáveis que influenciam o sistema. Como um exemplo típico é a separação e purificação da proteína taumatina, que foi purificada em 20 vezes e rendimento de 90-95% alcançados em um único passo usando SDFA (CASCONE et al., 1991).

Além da taumatina, o SDFA tem sido utilizado como processo pós-fermentação para a extração, separação, concentração e purificação primária de várias enzimas, dentre elas a xilanase, xilose redutase e β -glicosidase (GAIKAIWARI et al., 1996; VAIDYA et al., 2006). Devido ao seu potencial na remoção de contaminantes tais como ácidos nucleicos e as proteínas indesejáveis, sua utilização tem obtido sucesso na purificação de β -xilosidases e lisozimas em condições muito próximas da purificação total (PAN; LI, 2001; SU; CHIANG, 2006).

A recuperação destes produtos do meio fermentado é essencial em muitos processos industriais, e a dificuldade nos processos de recuperação depende significativamente da natureza do produto. Com isso, sob o ponto de vista econômico, o desenvolvimento e otimização de processos de recuperação e purificação de proteínas passaram a ser de vital importância na produção industrial dessas biomoléculas (SEADER; HENLEY, 1998).

2.6 Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um importante composto para as áreas biomédicas e de biomateriais (LI, 2001). É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons, sendo a designação PEG utilizada para os compostos de baixa massa molar (abaixo 20.000g/mol) e a designação PEO poli (óxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares (maiores que 20.000 g/mol). Os PEGs com massas molares menores que 1.000 g/mol são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas, já os de massas molares elevadas, acima de 1.000 g/mol, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura

ambiente, embora a 4°C a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (RIBEIRO, 2001).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, pelo fato de não se solubilizar com eles. Por ser um composto biodegradável e atóxico, a descarga de PEG não causa danos ao meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, são elas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água e agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos. Vale ressaltar que o PEG foi aprovado para consumo interno pelo FDA (Food and Drug Administration) (LI, 2001).

Por estas razões, o polietilenoglicol é o polímero padrão para os sistemas bifásicos aquosos. Além de, ser vantajosa sua utilização devido ao seu baixo custo, suas propriedades físicas e químicas são favoráveis, por não diminuir a atividade das biomoléculas e por ser biodegradável e atóxico como já citado (HARRIS, 1992).

2.7 Fatores que influenciam num sistema de duas fases aquosas

São muitas as variáveis que podem influenciar na formação de fases e na partição de biomoléculas dos sistemas bifásicos aquosos, entretanto, o equilíbrio e a separação das fases, são fatores importantes para todos os sistemas de duas fases aquosas. Para cada sistema formado por polímero/polímero ou polímero/sal, existe um diagrama de fases que define as proporções entre seus componentes formadores. Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura, porém é importante que ao se iniciar um trabalho com um novo tipo de sistema, se construa um diagrama adequado às condições de trabalho a serem utilizadas na extração, tais como, temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensões biológicas (ALBERTSSON, 1986; PORTO, 2004).

Vale lembrar que essas variáveis que induzem a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificados como variáveis inerentes ao próprio sistema (componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do

polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO; NERLI; PICÓ, 2004; PORTO, 2004), mas os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de Van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000).

No entanto, até onde é esclarecido, o efeito da massa molar dos polímeros depende da massa molar da biomolécula a ser separada. Por exemplo, as proteínas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO; ANDREWS, 2011).

Por sua vez, um aumento da massa molar do polímero geralmente diminui a partição de material biológico para a fase rica nele. Contudo, quanto maior for esta massa, menor será o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986).

Ainda em relação ao polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento de sua concentração e da viscosidade das fases, conseqüentemente, isto influencia a partição da proteína-alvo. Além disso, a concentração do polímero a ser usada para a separação de fases depende da massa molar do mesmo (PORTO, 2004).

A influência da carga da biomolécula na sua partição em SDFa pode ser estudada medindo o coeficiente de partição a vários valores de pH. Contudo, esta influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior

área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica. Como regra geral, as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao ponto isoelétrico) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG (PORTO, 2004).

A composição do sal é outra variável de grande importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares. Embora os sais se separem igualmente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição das proteínas em função do tipo de sal (COSTA et al., 1998).

Os sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema de duas fases, o lítio tem maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade para ambas as fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. Por exemplo, a partição dos íons fosfato para a fase inferior cria um potencial elétrico com uma carga negativa nesta fase que força a partição das macromoléculas ou células carregadas negativamente para a fase superior. Com o aumento da concentração de NaCl, o efeito da distribuição desigual dos íons fosfato pode ser reduzido ou eliminado. Com isto, a mudança na composição iônica pode influenciar, e muito, o coeficiente de partição de uma molécula (FORCINITI, 2002).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema utilizado. Para o sistema PEG/dextrana, foi constatado que para que ocorra a separação das fases é necessária uma concentração maior dos polímeros à medida que a temperatura é elevada. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG/sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada e o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI; HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995).

O tempo de separação das fases após a mistura dos componentes depende do tipo de sistema. Sistemas contendo PEG/sal possuem tempo de separação de

fases menor que os sistemas contendo PEG/dextrana devido à densidade e viscosidade do sistema (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/sais de fosfato têm sido amplamente utilizados para extração de proteínas diversas (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000; SRINIVAS et al., 2002; MAYERHOFF et al., 2004), mas outros sais estão sendo utilizados para a composição dos sistemas, tais como, sulfato de amônio (ZAVARZINA et al., 2002) e citrato de sódio (MARCOS et al., 2002).

Portanto, deve-se compreender como essas variáveis atuam de forma a influenciar as características do SDFA e a partição das moléculas para se obter êxito no processo de purificação.

2.8 Fermentação extrativa em sistema de suas fases aquosas

Como já mencionado, as duas fases mutuamente imiscíveis dos SDFA são gerados pela mistura formadora de componentes acima de uma concentração limiar (ALBERTSSON, 1986), a qual é descrita no diagrama de fases do sistema específico. Esses sistemas têm sido amplamente utilizados para o processamento pós-fermentação de compostos como enzimas (OOI et al., 2009; PORTO et al., 2008), biofármacos (ROSA et al., 2010; AZEVEDO et al., 2008) e outros produtos como ácidos orgânicos (SILVA et al., 2009). Porém, o uso do SDFA pode ser alargado à purificação espontânea no processo de fermentação, ou seja, através da fermentação extrativa. Neste tipo de fermentação, há integração da formação de produto e purificação num processo de etapa única, o que facilita a recuperação instantânea da biomolécula alvo (BANIK; SANTHIAGU, 2002).

Portanto, para definirmos, a fermentação extrativa é aquela onde há a integração da produção e recuperação da biomolécula *in situ* (Figura 7). Esta recuperação *in situ* de produtos provenientes de caldos fermentados sugere a aplicação de um sistema de duas fases aquosas como uma alternativa para extração de produtos biológicos da fermentação (ALBERTSSON, 1986).

Quando se trata de enzimas, o seu custo é um dos o principais fatores que determina a economia de todo o processo (PARK et al., 2002). Por esse motivo, o custo da enzima pura é considerada um dos maiores obstáculos para a

comercialização generalizada de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Nos últimos anos, os esforços de investigação concentram-se na redução do custo de produção e extração da enzima. Uma forma de diminuir o custo e agregar valor seria a utilização de resíduos, especialmente os agrícolas, agroindustriais e seus subprodutos. (RODRIGUEZ-COUTO; SANROMAN, 2005).

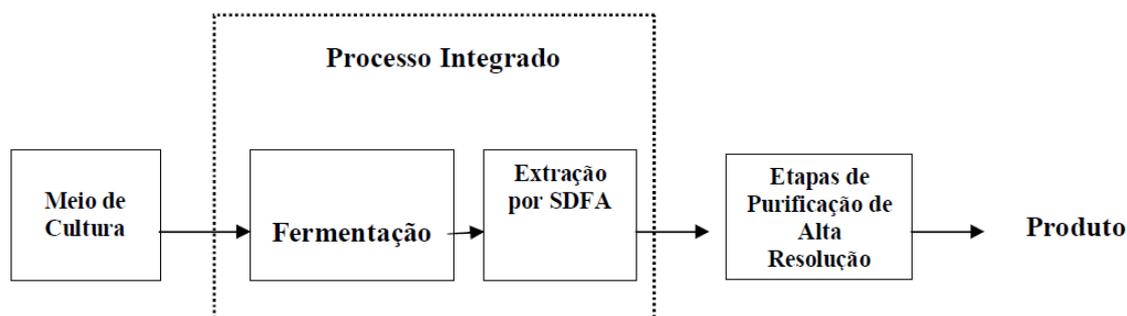


Figura 7. Representação simplificada do processo integrado do SDFa e fermentação para produtos extracelulares. Fonte: Rito-Palomares (2004).

Desta forma, o emprego da fermentação extrativa num sistema de duas fases aquosas, diminuiria também o custo da enzima, devido a sua característica de produção e extração acontecerem integradamente, eliminando-se assim algumas etapas para a purificação da enzima. Além disso, a fermentação extrativa é um método potencial para aumentar concentração do produto (DHAMOLE et al., 2012).

Na fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem se concentrar de preferência em uma das fases do sistema, enquanto que a biomolécula-alvo (produto) deve concentrar-se na fase oposta. Tal situação facilitaria a remoção do produto do seu local de produção logo que este fosse formado, assim eliminando a influência de inibidores, bem como realizando a purificação primária (MARQUES, 2011).

Na fermentação, o SDFa é adequado para o crescimento de células microbianas, devido ao alto conteúdo de água, baixa tensão interfacial e ambiente

relativamente biocompatível que pode estabilizar a célula (LEE; CHANG, 1990; CHEN; LEE, 1995).

No entanto, deve-se ter cuidado quanto ao oxigênio dissolvido e ao nível do efeito de corte na biomassa, pois são fatores importantes que influenciam bioprocessos utilizando polietilenoglicol, como uma fase de polímero e soluções de sais. A diminuição da taxa de transferência de oxigênio no meio de cultivo pode ocorrer com o aumento da concentração de soluto e de PEG, o que reduz significativamente a difusão e solubilidade do oxigênio; sendo este fator limitante na fermentação extrativa (BANIK et al., 2003); embora nenhum estudo ainda tenha sido realizado a respeito (MARQUES et al., 2009).

A fermentação extrativa em duas fases aquosas já foi demonstrada para a produção de enzimas como glucosidase (PERSSON; TJERNELD; HAHN-HÄGERDAL, 1989), protease alcalina (LEE; CHANG, 1990; HOTHHA; BANIK, 1997), enzimas celulolíticas (PERSSON; TJERNELD; HÄHN-HAGERDAL, 1991), enzimas fibrinolíticas (ASHIPALA; HE, 2008), α -amilase (ANDERSSON; JOHANSSON; HAHN-HAGERDAL, 1985; KIM; YOO, 1991), β -galactosidase (KUBOI; UMAKOSHI; KOMASAWA, 1995), lipase (OOI et al., 2011, SHOW et al., 2012), fosfatase alcalina (PANDEY; BANIK, 2011) e tanase (RODRÍGUEZ-DURÁN et al., 2013).

2.10. Gênero *Aspergillus* e Produção de Xilanases

Eucariontes ubíquos, os fungos estão distribuídos em aproximadamente 1,5 milhões de espécies, das quais, somente cerca de 5% estão identificadas atualmente (BETINI, 2006). Em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a diversos substratos, entre os quais efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais e resíduos derivados de petróleo (TAVARES et al., 1998).

A utilização de fungos como produtores de enzimas tem muitas vantagens, considerando que as enzimas produzidas são normalmente extracelulares, tornando fácil sua recuperação no caldo ou substrato fermentado; além disso, os fungos como produtores de enzimas são mais seguros do que as bactérias, pois estes já são

reconhecidos pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos, e seus produtos derivados podem ser destinados ao consumo humano (SAID et al., 2004).

Dentre as vantagens existentes na utilização de fungos filamentosos para a produção de enzimas por processos fermentativos, podemos citar o fácil cultivo e a alta produção de enzimas extracelulares de grande potencial industrial (GUIMARÃES, 2006).

Muitos pesquisadores têm abordado a aplicação de fungos filamentosos na biotecnologia, observando aspectos distintos como a produção de enzimas por processos fermentativos, em condições controladas e reproduzíveis (ALVES et al., 2002). O controle de aspectos físico-químicos tais como temperatura, pH, composição do meio nutriente, aeração e agitação do meio, aliados ao controle de agentes como indutores, repressores, e outros que afetam o metabolismo e a secreção da enzima pelo micro-organismo, podem proporcionar um aumento na produção por processos fermentativos, em condições submersa ou semi-sólida (PANDEY et al., 2000).

O interesse pelo uso de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* em processos industriais vem aumentando nos últimos anos, proporcionando vantagens econômicas na produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico (destacando-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases), ácidos orgânicos (como o ácido cítrico), na produção de fármacos como alguns antibióticos, no controle de pragas da agricultura, no controle de inúmeras moléstias que atacam as plantas cultivadas e na produção de etanol (CAMPBELL; BEDFORD, 1992; KIM et al., 2003).

Embora a maioria das espécies de *Aspergillus* seja saprófita, algumas são parasitas de insetos, plantas e animais, incluindo o homem. Algumas espécies produzem potentes toxinas, enquanto outras são igualmente significantes como agentes de biodeterioração, economicamente importantes para fabricação de alimentos fermentados ou como fontes de enzimas (BETINI, 2006).

Este gênero inclui aproximadamente 185 espécies. Das quais 20 espécies foram informadas como agentes causadores de infecções oportunistas no homem. Entre essas, *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais comumente isolada, seguida por *A. flavus* e o *A. niger*. As espécies *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A.*

oryzae, *A. terreus*, *A. ustus*, e *A. versicolor* estão entre as espécies menos isoladas como agentes patógenos oportunistas (LARONE, 1995).

A literatura traz algumas espécies conhecidas como produtoras de xilanase, podendo-se destacar: *A. awamori* (ADOLPH et al., 1996; VERBRUGEM et al., 1998), *A. fischeri* (RAJ; CANDRA, 1996), *A. nidulans* (MACCABE et al., 1998), *A. oryzae* (BAKALOVA et al., 1996; KITAMOTO et al., 1999), *A. phoenicis* (RIZZATTI et al., 2001), *A. sojae* (KIMURA et al., 1995) *A. niger* (SARDAR et al., 2000; PAL; KHANUN, 2011), *A. tamaris* (KADOWAKI et al., 1997), *A. versicolor* (CARMONA et al., 1997), *A. caespitosus* (SANDRIM et al., 2003), *A. foetidus* (CHAPLA et al., 2010; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012) e *Aspergillus fumigatus* (DAS et al., 2013).

4. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

4.1. Objetivo geral

Produzir xilanase por *Aspergillus tamaris* URM4634 por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas (PEG/Citrato).

4.2. Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições fermentativas para a produção da enzima em sistema de duas fases aquosas;
- Caracterizar parcialmente a enzima;
- Escalonar a produção da enzima a nível piloto;
- Verificar a influência da digestão monogástrica sobre a atividade da xilanase.

5. REFERÊNCIAS

ADEOLA, O.; COWIESON, A. J. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Science*; v. 89, p. 3189–3218, 2011.

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. *Wiley-Interscience*, New York, p. 346, 1986.

AL-DAJANI, W. W.; TSCHIRNER, U. W. Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent ASA and ASAM pulping: comparison of autohydrolysis and alkaline extraction. *Holzforschung*, v. 64, p. 411–416, 2010.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J. e SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, no 1, p. 21-28, 1998.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, 325-330, 2002.

ANDERSSON, E.; JOHANSSON, A. C.; HAHN-HAGERDAL, B. Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microbial Technology*, v 7, p. 333–338, 1985.

ARNOLD, F. Metal-affinity separation: a new dimension in protein processing. *Biotechnology*, v. 9, p. 151-156, 1991.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 8826 - 8835, 2011.

ASHIPALA, O. K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4112–4119, 2008.

AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic interaction chromatography and size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1213, p. 154–161, 2008.

BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 75, n. 2, p. 532-537, 2010.

BAE, H. J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3513–3519, 2008.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry, *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 147–157, 1999.

BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A. Extractive fermentation for enhanced xylanhydrolysing enzyme production by *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 715–720, 2002.

BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A.; KANARI, B.; SABARINATH, C.; UPADHYAY, S. N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems, *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 337–348, 2003.

BEIJERINCK, M.W. *Zentralblatt Fur Bakteriologie-international Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases*, v. 2, p.627-689, 1896.

BELANCIC, A.; SCARPA, J.; PEIRANO, A.; DIAZ, R.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes, *Journal Biotechnology*, v. 41, p. 71–79, 1995.

BETINI, J. H. A. Estudos comparativos de xilanases produzidas por três espécies de *Aspergillus* visando a aplicação no biobranqueamento de polpa de celulose para fabricação de papel. Dissertação. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de Concentração: Biologia Comparada. Ribeirão Preto, p. 114, 2006.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIRKENMEIER, G.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; STIGBRAND, T.; KOPPERSCHALÄGER, G. Immobilized metal ion affinity partitioning, a method combining metal-protein interaction and partitioning of proteins in aqueous twophase systems. *Journal of Chromatography*, v. 539, p. 267-277, 1991.

BLANCO, A.; VIDAL, J. F.; COLOM, J. F.; PASTOR, F. I. J. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* spp. strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 4468-4470, Washington, 1995.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology Progress*, v. 25, p. 315–322, 2009.

CAMPBELL, G.; BEDFORD, M. Enzyme applications for monogastric feeds; a review. *Canadian Journal Animal Science*, v.72, p. 449–466, 1992.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. *Enzyme Microbiology Technology*, v.13, p.629, 1991.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: *Bioquímica Ilustrada*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 446 p.p. 53-66, 1989.

CHEN, J. P.; LEE, M. S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 17, p. 1021–1027, 1995.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWARA, D.; SHAHA, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 361–369, 1989.

CHAPLA, D.; PANDIT, P., SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 215 – 221, 2012.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Milling International*. June, v. 13-26, 1997.

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

CONTE, A. J.; TEXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; MINUIZ, J. A. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. *Ciência Agrotécnica*, v. 26, p. 1289-1296, 2002.

CONTE, A. J.; TEXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; SCHOULTEN, N. A.; BERTECHINI, A. G. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 1147-1156, 2003.

COSTA, A. R. Partição De Lactoferrina Em Sistemas Aquosos Bifásicos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Programa De Pós-Graduação Em Engenharia De Alimentos, Itapetinga, 2010.

COSTA, S. A.; PESSOA JR. A.; ROBERTO, I. C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental desing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.629, p. 70-72, 1998.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 339-348, 2000.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves In: Simpósio Internacional ACVEMBRAPA sobre nutrição de aves, Concórdia, SC. Anais, p. 129, 1999.

CUNHA, T.; AIRES-BARROS, R. Large-scale extraction of proteins, *Molecular Biotechnology*, v. 20, p. 29–38, 2002.

DAS, A.; PAUL, T.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 290–296, 2013.

DHAMOLE, P. B.; WANGA, Z.; LIU, Y.; WANGA, B.; FENG, H. Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production. *Biomass and bioenergy*, v.40, p. 112 -119, 2012.

DEKKER, R. F. H. Biodegradation of the hemicelluloses. In T. Higuchi (Ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. Orlando, FL: Academic Press, Inc, pp. 505–533, 1985.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, v.30, p. 1627 - 1640, 2012.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemistry Engineering*, v.47, p.89-135, 1992.

DOURADO, L. R. B. Enzimas exógenas em dietas para frangos de corte. PhD Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.

DOMENE, S.M.A. Estudo do valor nutritivo mineral do farelo de arroz. Utilização do zinco, ferro, cobre e cálcio pelo rato em crescimento. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) - UNICAMP. 104p.,1996.

DYR, J. E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography B*, v. 699, p. 383-401, 1997.

EBRINGEROVA, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, v. 232, p.1-12, 2006.

ELEGIR, G.; SZAKACS, M.; JEFFRIES, T. W. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces* sp. strain B-12-2. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 2609–2615, 1994.

Ensino de Ciências Naturais, Disponível em: <<http://accbarroso60.wordpress.com/2011/03/02/botanica-plantas>>. Acesso em 10 de novembro de 2012.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5938–5941, 2008.

FERIA, M. J.; LOPEZ, F.; GARCIA, J. C.; PEREZ, A.; ZAMUDIO, M. A. M.; ALFARO, A. Valorization of *Leucaena leucocephala* for energy and chemicals from autohydrolysis. *Biomass Bioenergy*, v. 35, p. 2224–2233, 2011.

FIALHO, F.B. Disponibilidade de manganês do farelo de arroz para frangos de corte. 1991. 156p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Curso de pós graduação em Nutrição Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; POULSEN, C.; BORCH SOE, J.; ZARGAHI, M. R.; ROUAU, X. Enzymatic solubilization of arabinoxylans from native, extruded, and high-shear-treated rye bran by different endo-xylanases and other hydrolyzing enzymes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4240– 4249, 2004.

FORCINITI, D.; HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. *Fluid Phase Equilibria*, v.61, p.243 - 262, 1991.

FORCINITI, D. Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols. In: KAUL, R. H. *Methods in Biotechnology*, Human Press Inc, Totowa, NJ, v.11, 2002.

FOYE, L.; BOULAFLOUS, A.; BENCHANE, M.; GOMORD, V.; MICHAUD, D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine*, v. 23, p.1770– 1778, 2005.

FRANCESCH, M. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en avicultura. In: Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal, Madrid. *Anais Madrid*: FEDNA, p.118-131, 1996.

FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T.; ASENJO, J. A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein characteristics in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 300-308, 1996.

FRANK, T. C.; DAHURON, L.; HOLDEN, B. S.; PRINCE, W. D.; SEIBERT, A. F.; WILSON, L. C. Liquid-liquid Extraction and other liquid-liquid operations and equipment, Perry's Chemical Engineers' Handbook. McGraw-Hill, 2008.

GARROTE, G.; KABEL, M. A.; SCHOLS, H. A.; FALQUE, E.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Effects of *Eucalyptus globulus* wood autohydrolysis conditions on the reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9006–9013, 2007.

GAVASANE, M. R.; GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of Penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p. 665-675, 2003.

GAIKAIWARI, R.; SHENDYE, A.; KULKARNI, N.; RAO M. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)–K₂HPO₄ system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 23, p. 237– 241, 1996.

GUENTER, W. Pratical experience with the use of enzymes. Disponível em: <<http://www.idre.ca/books/focus/821/chp6.html>>. Acessado em 10 de fevereiro de 2012.

GUPTA, R.; LEE, Y. Y. Pretreatment of hybrid poplar by aqueous ammonia. *Biotechnology Progress*, v. 25, p. 357–364, 2009.

GHOSH, M.; AMITABHA, D.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 15, p. 703 -709, 1993.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M. RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; BARBOSA JUNIOR, A.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 474-480, 2006.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p.255-258, 2000.

HARRIS, J. M. Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: *Biochemical and biomedical applications*. New York: Plenum Press, 1992.

HEINZE, T.; KOSCHELLA, A.; EBRINGEROVA, A. Chemical functionalization of xylan: A short review. In P. Gatenholm & M. Tenkanen (Eds.), *Hemicelluloses: Science and technology*, ACS Symposium Series, 864, 312–325, 2004.

HENN, J. D. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolase. *Biochemistry Journal*, v. 316, p. 695–696, 1996.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology*, v. 7, p. 637–644, 1997.

HOSENEY, R. C.; FAUBION, J.M. A mechanism for the oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans. *Cereal Chemistry*, v. 58, p. 421- 424, 1981.

HOTHA, S.; BANIK, R. M. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*, v. 69, p. 5–10, 1997.

JELACA, S. L.; HLYNKA, I. *Cereal Chemistry*, v. 48, p. 211-222, 1971.

JELACA, S. L.; HLYNKA, I. *Cereal Chemistry*, v. 49, p. 489-495, 1972.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215-227, 2001.

KIM, S. H.; YOO, Y. J. Characteristics of an aqueous two-phase system for amylase production. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 71, p. 373–375, 1991.

KIM, S. K.; D'APPOLONIA, B. L. *Cereal Chemistry*, v. 54, p. 225-229, 1977.

KIM, H. W.; KIM, Y. O.; LEE, J. H.; KIM, K. K.; KIM, Y. J. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braaki*. *Biotechnology Letters*, v. 25, pp. 1231–1234, 2003.

KOPPERSCHLÄGER, G. Affinity extraction with dye ligands. *Methods in Enzymology*, v. 228, p. 121-136, 1994.

KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology*, v. 27, p. 663 - 693, 2003.

KUBOI, R.; UMAKOSHI, H.; KOMASAWA, I. Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase systems to produce intracellular -galactosidase. *Biotechnology Progress*, v. 11, p. 202–207, 1995.

KUSAKABE, I.; YASUI, T.; KOBAYASHI, T. Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-containing natural materials. Part 1: increase in the susceptibility for enzymatic action of native xylan in natural materials with pretreatment. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, v. 50, n. 5, p. 199–208, 1976a.

KUSAKABE, I.; YASUI, T.; KOBAYASHI, T. Enzymatic hydrolysis-extraction of xylan from xylan-containing natural materials. Part 2: survey of optimum conditions for NaOHpretreatment of corncobs. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, v. 50, n. 5, p. 209–215, 1976b.

KULA, M-R.; KRONER, K. H.; HUSTED, T.H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemical Engineering*, v.24, p.73-118, 1982.

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

KUNG J. R. L.; TREACHER, R. J.; NAUMAN, G. A.; SMAGALA, A. M.; ENDRES, K. M.; COHEN, M. A. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.83, p. 115–122, 2000.

LARONE, D. H. *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C., 1995.

LECZNIESKI, J. L. Considerações práticas do uso de enzimas. Florianópolis. In: *Seminário Internacional de Aves e Suínos*. Florianópolis. Anais Florianópolis: AVESUI, v. 5, p.34-46, 2006.

LEE, Y. H.; CHANG, H. N. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 69, p. 89–92, 1990.

LI, J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): Derivatives and applications in biomaterials. *BME*, 430, 2001.

LINDBLAD, M. S.; ALBERTSSON, A. C. Chemical modification of hemicelluloses and gums. In S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* (2nd ed., pp. 491–508). New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 2004.

LIU, W.; YUAN, Z.; MAO, C.; HOU, Q.; LI, K. Removal of hemicelluloses by NaOH pre-extraction from aspen chips prior to mechanical pulping. *BioResources*, v. 6, p. 3469–3480, 2011.

LOPEZ, F.; FERIA, M. J.; GARCIA, J. C.; ZAMUDIO, M. A. M.; PEREZ, A. Energy and autohydrolysis by-products from industrial crops. *International Conference Ren En Power*, 2010a.

MARCOS, J. C.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of *Penicillin acylase* purification in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p.1006-1014, 2002.

MARQUES D. A. V, TORRES, B. R.; PORTO, A. L. F; PESSOA-JÚNIOR, A.; CONVERTI, A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and

extractive fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 47, p.122–126, 2009.

MARQUES D. A. V.; PESSOA-JÚNIOR, A.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PEREGO, P.; PORTO, A. L. F. Extractive Fermentation of Clavulanic Acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Using Aqueous Two-Phase System. *Biotechnology Progress*, vol. 27, p. 95-103, 2011.

MATTE, A.; FORSBERG, C. W. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 157–168, 1992.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.18, p.217-223, 2004.

MC KILLIP, W.J.; SHERMAN, E. Kirk-Othmer - Encyclopedia of Chemical Technology, M. Grapson ed., vol 11, John Wiley & Sons, 499-527, New York, 1980.

MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of the Fungi. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, p. 574, 1996.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.

NINAWA, S.; KUHAD, R. C. Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2291–2295, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica, 4^o ed. Editora Sarvier. São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 766, p. 27-36, 2001.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexoquinase in aqueous two phase polyethylene glicol/citrate systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105-108, p. 787-797, 2003.

OLIVEIRA, R. M. Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas. Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2006.

OLSSON, L., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 312–331, 1996.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; ARIFF, A.; WU, H. S.; LAN, J. C. W. Direct purification of *Burkholderia pseudomallei* lipase from fermentation broth using aqueous twophase systems. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 14, p. 811–818, 2009.

OOI, C. W.; HII, S. L.; KAMALA, S. M. M.; ARIFF, A.; LING, T. C. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 68–73, 2011.

PADILHA, G. S.; FERREIRA, J. F.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. *Acta Scientiarum*, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2011.

PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 879–887, 2011.

PAN, I. H.; LI, Y. K. Rapid process for purification of an extracellular bxylosidase by aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, v. 754, n.1, p.179–84, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products, *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-69, 2000.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4226–4231, 2011.

PARK, Y. S.; KANG, S. W.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p.761–766, 2002.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Production of -glucosidase with *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. *Biotechnol Technology*, v. 3, p. 265–70, 1989.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HÄHN-HAGERDAL, B. Influence of cultivation conditions on the production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 in aqueous two-phase systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 9–25, 1991.

PETZOLD, K.; SCHWIKAL, K.; GÜNTHER, W.; HEINZE, T. Carboxymethyl xylan – control of properties by synthesis. *Macromolecular Symposia*, v. 232, p. 27–36, 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*, v. 67, p. 577–591, 2005.

PORTO, T.S. Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas Utilizando PEG/Citrato. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. p.87. São Paulo, 2004.

PORTO, T. S.; MEDEIROS E SILVA, G. M.; PORTO, C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA Jr, A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 47, p. 716–721, 2008.

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering*, v. 13, p. 100–131, 1995.

RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863–871, 2003.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella*. A study of O-acetyl group migration. *Carbohydrate Research*, v. 135, p. 129-140, 1984.

RIBEIRO, M. Z. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, 138p., 2001.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phases partition to process development for the recovery of biological products: review. *Journal of chromatography B: Analytical technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 807, n.1, p. 3-11, 2004.

RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 156-160, 2001.

RODRIGUEZ-COUTO, S.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 22, p. 211–219, 2005.

RODRÍGUEZ-DURÁNA, L. V.; SPELZINIB, D.; BOERISB, V.; AGUILARA, C. N.; PICÓB, G. A. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, p. 392–397, 2013.

ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. J. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal Chromatography A*, v. 1217, p. 2296, 2010.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 279–291, 2003.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 412 p., 2004.

SAMAYAM, I. P.; SCHALL, C. A. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3561–3566, 2010.

SANDRIM, V. C. Estudo das atividades xilanásicas produzidas pelo fungo *Aspergillus caespitosus*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto de Química – UNESP, Ribeirão Preto, p. 4, 2003.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p.117-120, 1994.

SASAKA, M.; OZER, E. Aqueous Extraction of sugar canecorn cob hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, p. 517–523, 1995.

SASSNER, P.; MARTENSSON, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 137–145, 2008.

SAULNIER, L.; MAROT, C.; CHANLIAUD, E.; THIBAUT, J-F. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 279-287, 1995.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, p. 263–89, 2010.

SEADER, J. P.; HENLEY, J. E. Separation process principles. John Wiley & Sons, New York, p.886,1998.

SENS, R.F. Avaliação da suplementação das enzimas xilanase e β -mananase em rações para perus. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná. 108p., Curitiba, 2009.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 219–228, 2003.

SHOW, P. L.; TAN, C. P.; ANUAR, M. S.; ARIFF, A.; YUSOF, Y. A.; CHEN, S. K.; LING, T. C. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 116, p. 226–233, 2012.

SIERRA, R.; GRANDA, C.; HOLTZAPPLE, M. T. Short-term lime pretreatment of poplar wood. *Biotechnology Progress*, v. 25, p. 323–332, 2009.

SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T.; GRANDA, C. B. Long-term lime pretreatment of poplar wood. *AIChE Journal*, v. 57, p. 1320–1328, 2011.

SILVA, C.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M.; HOKKA, C.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 32, p. 625–632, 2009.

SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, p. 1345–1351, 2006.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Substrato, ação, produção e aplicação de pectinases, hemicelulases e celulasas no processamento de alimentos: revisão. *Bol SBCTA*, v. 31, n. 2, p. 249–260, 1997.

SILVERSIDES, F. G.; BEDFORD, M. R. Effect of pelleting temperature on the recovery and efficacy of a xylanase enzyme in wheat-based diets. *Poultry Science*, v. 78, p. 1184–1190, 1999.

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Review*, v. 27, p. 3–16, 2003.

SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea peroxidase*. *Journal of Food Engineering*, v. 54, p. 1–6, 2002.

SPELZINI, D.; PELETEIRO, J.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. Polyethyleneglycol-pepsin interaction and its relationship with protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 67, p. 151, 2008.

SUH, S. S.; ARNOLD, F. H. A mathematical model for metal affinity protein partitioning. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, p. 682–690, 1990.

SU, C. K.; CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 257–63, 2006.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, p. 33–64, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 17, p. 39–67, 1997.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. R.; DA SILVA, R.; TRABUCO, E. Utilização de resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p.722-725, 1998.

TEIXEIRA, A. S. Exigências nutricionais de zinco e sua biodisponibilidade em sulfatos e óxidos de zinco para pintos de corte. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Curso de pós graduação em Produção Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 172p, 1994.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. *Journal of Chromatography B*, v. 799, p. 293-301, 2004.
USTINOV, B. B.; GUSAKOV, A. V.; ANTONOV, A. I.; SINITSYN, A. P. Comparison of properties and mode of action of six secreted xylanases from *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, n. 1, p. 56–65, 2008.

VAIDYA, B. K.; SUTHAR, H. K.; KASTURE, S.; NENE, S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, p. 161–166, 2006.

VENÂNCIO, A. A. D. Caracterização de novos sistemas para partição bifásica de biomoléculas. Tese (Doutorado em Engenharia Biológica), Universidade do Minho, Braga. 154p., 1996.

VERNAU, J.; KULA, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.12, p.379-404, 1990.

WENK, C.; WEISS, E.; BEE, G. Interaction between a phytase and a carbohydrase in a pig diet. In: Wenk, C and Boessinger, M. Enzymes in animal nutrition – 1 st symposium. Proceeding Kartause Ittingen, Switzerland. October 13-16, p. 160- 164, 1993.

WETHEARLY, L. R. Engineering processes for bioseparations. *Butterworth-Heinemann Ltd*; 1994.

WHISTLER, R. L.; RICHARDS, E. L. "Hemicelluloses" em *The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry*, Pigman W. e Horton D. ed., vol IIA, Academic Press, New York, p. 447-469, 1970.

WHISTLER, R. L.; SMART, C. L. "Polysaccharide Chemistry", cap IV, Academic Press Inc., New York, 1953.

WHISTLER, R.; MASEK, E. Enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of the American Chemical Society*, v. 77, p. 1241–1243, 1955.

WONG, K. K. Y.; TAN L. U. L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiology Reviews*, v. 52, p. 305–317, 1988.

WUBAH, D. A.; AKIN, D. E.; BORNEMAN, W. S. Biology, fiber-degradation, and enzymology of anaerobic zoospore fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 19, p. 99–115, 1993.

YANEZ, R.; GARROTE, G.; JESUS, D. I. A. Z. M. Valorisation of a leguminous specie, *Sesbania grandiflora*, by means of hydrothermal fractionation. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6514–6523, 2009a.

YANEZ, R.; ROMANI, A.; GARROTE, G.; LUIS ALONSO, J.; CARLOS PARAJO, J. Processing of *Acacia dealbata* in Aqueous Media: first step of a wood biorefinery. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 48, p. 6618–6626, 2009b.

YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG, W. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *LWT*, v. 38, p. 677–682, 2005.

ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, Santa Maria. *Anais Simpósio de nutrição animal*, p. 37-49, 2001.

ZAVARZINA, A. G.; DEMIN, V. V.; NIFANT`EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; DANILOVA, T. V.; SPIVAKOV, B. Y. Extraction of humic acids and their fractions in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems. *Analytica Chimica Acta*, v.452, p. 95-103, 2002

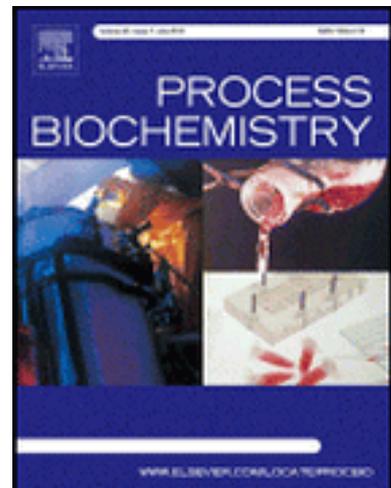
ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous Two-Phase Partitioning. *Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*; Marcel Dekker: New York, 1995.

CAPITULO I

Caracterização da xilanase produzida por fermentação extrativa em biorreator.

A ser submetido à revista:

Process Biochemistry



1 **Caracterização da xilanase produzida por fermentação extrativa em biorreator**

2 Anna Carolina da Silva ^a, Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento ^a, Cristine
3 Rodrigues ^b, Cristina Maria Souza-Motta ^c, Luciana Porto de Souza Vandenberghe ^b,
4 Carlos Ricardo Soccol^b, *Keila Aparecida Moreira ^a, Polyanna Nunes Herculano ^d.

5
6 (a) Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de
7 Pernambuco. Avenida Bom Pastor, s/n, Mundaú, CEP: 55296-901,
8 Garanhuns-PE, Brasil.

9 (b) Universidade Federal do Paraná/Centro Politécnico. Av. Coronel Francisco
10 Heráclito dos Santos,210 - Jardim das Américas, CEP: 81531-970, Curitiba-
11 PR, Brasil.

12 (c) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco. Av.
13 Moraes Rego, s/n. Recife. CEP 50670. 901.

14 (d) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de
15 Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife – PE, Brasil.

16
17
18 * Autor para correspondência: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
19 Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP: 55292-270, Garanhuns-PE, Brazil.
20 Telefones: (87) 3764-5500, FAX: (87) 376405520. E-mail:
21 moreiralab@yahoo.com.

23 **Resumo** - Das muitas aplicações da xilanase relatadas, o seu uso como
24 suplemento em rações tem sido de grande importância para animais
25 monogástricos a medida que a adição da xilanase em suas dietas melhora a
26 utilização dos nutrientes contidos nos alimentos ricos em xilana. Nesse
27 sentido, objetivou-se com este trabalho produzir xilanase por fermentação
28 extrativa em sistema de duas fases aquosas utilizando *Aspergillus tamarii*
29 URM 4634, aumentar a escala de produção em biorreator, caracterizar a
30 xilanase parcialmente e avaliar a influência *in vitro* da digestão monogástrica
31 em sua atividade. Com aplicação da fermentação extrativa em biorreator
32 foram obtidos atividade xilanásica total de 331,4 U mL⁻¹ e rendimento de
33 72%, a xilanase produzida é estável ao pH e à temperatura, sendo
34 otimamente ativa em pH 3,6 e 90 °C. Foi ativada em 6% na simulação da
35 digestão monogástrica completa e apenas o Mg²⁺ inibiu sua atividade a 5mM.
36 A xilanase produzida pelo *Aspergillus tamarii* URM4634 possui grande
37 potencial para ser empregada industrialmente.

38

39 **Palavras-chave:** SDFA, biorreator, xilana, complexo xilanolitico e
40 suplementação enzimática.

41

42

43

44

45

46

47 **Introdução**

48 A hidrólise da hemicelulose implica na participação de hidrolases que agem
49 cooperativamente, no entanto, a principal enzima envolvida na despolimerização da
50 xilana é a endo β -1,4-xilanase [1]. As β -1,4-endoxilanases (1,4- β -D-xilana
51 xilohidrolase, EC 3.2.1.8) são comuns na natureza e têm sido produzidas por algas,
52 protozoários, moluscos, crustáceos, insetos, sementes de plantas terrestres,
53 bactérias e por grande número de fungos, principalmente os pertencentes ao gênero
54 *Aspergillus* [2]. Mas, fungos filamentosos que produzem xilanases são
55 particularmente interessantes do ponto de vista industrial, porque possuem uma alta
56 produção desta enzima quando comparados a leveduras e bactérias [5].

57 Essas enzimas podem ser utilizadas na dieta de animais monogástricos com
58 a finalidade de hidrolisar os polissacarídeos não-amiláceos, como as β -glucanas e
59 arabinoxilanas encontrados em vegetais, aumentando a conversão alimentar, o
60 ganho de peso do animal e conseqüentemente, o lucro da produção [3, 4].

61 Porém, do custo total associado à produção enzimática, aproximadamente de
62 50-80%, estão relacionados com os processos pós-fermentativos na tentativa de
63 extrair e purificar a enzima. Este alto custo pode ser atribuído aos métodos
64 convencionais de purificação de proteínas que são geralmente caros devido à
65 necessidade da realização em várias etapas, custo com reagentes e da dificuldade
66 em expandir o processo em nível de escala industrial; por isso é necessário o
67 desenvolvimento de novos métodos que visem a produção em grandes escalas
68 utilizando baixo custo de produção, para que sejam produzidas quantidades
69 suficientes da enzima a fim de suprir a demanda comercial [6,7]. Desta forma, existe
70 crescente interesse no desenvolvimento de processos inovadores para a separação

71 e purificação de biomoléculas, que sejam economicamente viáveis e que preservem
72 a atividade biológica das proteínas [8,9].

73 A fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas tem sido relatada
74 como uma excelente alternativa para reduzir o custo total de produção da enzima,
75 devido à sua característica de produção e extração do produto ocorrer integralmente
76 *in situ*, eliminando algumas etapas para a purificação da enzima, portanto, uma
77 solução tecnológica e científica que supera os problemas da baixa produtividade
78 volumétrica característica das operações biotecnológicas, devido à inibição do
79 produto [10]. O conceito do presente processo de purificação em *in situ* envolve a
80 integração de uma etapa da extração, a primeira fase de processamento pós-
81 fermentação para sintetizar e simultaneamente remover o produto. Isto é não só
82 assegurar a recuperação primária, mas também aumentar a taxa de formação de
83 produto, minimizando a inibição pelo produto final durante a fermentação. Além
84 disso, o sistema de duas fases aquosas proporciona um ambiente não desnaturante
85 para os compostos biolábeis [11]. Portanto, objetivou-se com este trabalho
86 caracterizar parcialmente a xilanase produzida por *Aspergillus tamaritii* URM 4634
87 através de fermentação extrativa em biorreator.

88

89 **Materiais e Métodos**

90 **Micro-organismo**

91 *Aspergillus tamaritii* URM 4634 foi obtido da Coleção de Culturas Micoteca
92 URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da
93 Universidade Federal de Pernambuco e mantido em tubos de ensaio contendo meio

94 batata dextrose ágar (BDA). Para esporulação o fungo foi crescido em placas de
95 Petri contendo o meio ágar Czapek por cinco dias, a 28 °C.

96 **Produção de xilanase em frascos**

97 Primeiramente, para a produção da xilanase foi utilizada a fermentação
98 extrativa em sistema de duas fases aquosas (SDFA), realizada em Erlenmeyers de
99 125 mL contendo 30g totais do SDFA composto por polietilenoglicol, citrato de sódio,
100 ácido cítrico, extrato de levedura (0,5%) e farinha da entrecasca de mandioca (2%);
101 a água foi adicionada em massa a fim de completar os 30g finais. A massa molar do
102 polietilenoglicol (PEG), (MM_{PEG}), as concentrações de citrato de sódio (C_C) e do PEG
103 (C_{PEG}) e o pH dos sistemas variaram de acordo com um planejamento fatorial 2^4
104 (Tabela 1). Cada ensaio foi realizado de forma aleatória e em triplicata. O inóculo foi
105 preparado a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} e a fermentação foi mantida a
106 28°C, 120 rpm, por até 144h.

107 Ao serem determinadas as melhores condições para a produção de xilanase
108 nesse primeiro experimento, foi realizada uma cinética de produção em Erlenmeyers
109 do micro-organismo, em que alíquotas foram retiradas a cada 24 horas até 144
110 horas de fermentação. Os parâmetros de produção e extração avaliados foram:
111 atividade xilanásica, dosagem de proteínas totais, pH, rendimento de extração e
112 coeficiente de partição.

113

114 **Produção da xilanase em biorreator**

115 Depois de determinadas as melhores condições de fermentação e o melhor
116 tempo na cinética de produção; a fermentação extrativa utilizando SDFA foi

117 realizada em biorreatores com capacidade total de 10 L e 7 L utilizáveis, sendo
118 composto de polietilenoglicol, citrato de sódio, ácido cítrico (em concentrações
119 determinadas pelo melhor resultado do planejamento fatorial em frascos), extrato de
120 levedura (0,5%), farinha da entrecasca de mandioca (2%), e água em massa que
121 completasse um total de 5000g. Nesta etapa foram utilizadas as melhores condições
122 de MM_{PEG} , C_C e C_{PEG} selecionadas no planejamento fatorial realizado em frascos
123 agitados. O inóculo foi preparado em 10^6 esporos mL^{-1} e a fermentação
124 acompanhada por 96 horas. Alíquotas foram coletadas a cada 24 horas para
125 posterior análise de atividade xilanásica, dosagem de proteínas totais, coeficiente de
126 partição, rendimento e pH. A fermentação ocorreu a 28°C, 150 rpm e aeração
127 forçada a 9L/minuto.

128 O extrato enzimático foi obtido a partir da filtração do meio fermentado, com
129 auxílio de bomba de vácuo. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 5000g durante
130 10 min a 4°C. Em seguida os volumes totais e de cada fase foram medidos para
131 posterior cálculo do rendimento. Por fim, as fases foram separadas e utilizadas para
132 a realização dos processos analíticos como determinação de proteínas totais e
133 atividade xilanásica.

134

135 **Determinações Analíticas**

136 Para determinar as proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford
137 modificado [12], que utiliza o corante “*Coomassie Brilliant Blue*” e albumina de soro
138 bovino foi utilizada como padrão. As determinações foram realizadas em triplicata
139 em cada amostra e a média do resultado foi utilizada. A atividade xilanólítica foi
140 determinada de acordo com a metodologia descrita por Bailey [13], tendo como

141 substrato a xilana (Sigma -ALdrich, St Louis, EUA) a 1% (w/v), solubilizada em
142 tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0 a 60°C, onde 0,9 mL desta solução foi
143 estabilizada em banho-maria a 50°C durante 5 minutos. Em seguida, 0,1 mL de
144 extrato enzimático foi acrescentado e incubado também durante 5 minutos a 50°C.
145 Após este período, a reação foi parada pela adição de ácido dinitrossalicílico 1500µL
146 (DNSA) e por meio deste reagente, os açúcares redutores liberados pela ação da
147 xilanase, foram determinados segundo metodologia de Miller [14] e a xilose (Sigma-
148 ALdrich, St Louis, EUA) foi utilizada como padrão nas concentrações de 0 a 2 mg
149 mL⁻¹. A atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária
150 para liberar 1µmol de açúcares redutores por minuto e expressa em unidades por
151 mL (U mL⁻¹).

152

153 **Determinação do coeficiente de partição (k) e rendimento (R)**

154 O coeficiente de partição (k_x) da atividade xilanásica (mg mL⁻¹) foi determinado
155 como a relação da atividade xilanásica na fase *top* (AT) e a fase *bottom* (AB) [15,
156 16] (1):

$$157 \quad (1) \quad K_x = \frac{AT}{AB}$$

158 Para determinar o coeficiente de partição para as proteínas totais (k_{PT}), os
159 valores de atividade xilanásica nas fases *top* e *bottom* foram substituídos pelos
160 valores de proteínas para cada fase.

161 A fim de se avaliar o rendimento de xilanase na fermentação extrativa, foi
162 utilizada a equação (2):

163 (2) $Rendimento (100\%) \frac{100}{1+(\frac{1}{V_r} * K)}$

164 Onde V_r é a razão entre os volumes de cada fase do sistema e k o coeficiente de
165 partição da xilanase.

166

167

168 **Efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade ao pH**

169 O pH ótimo para a atividade enzimática da xilanase foi determinado utilizando
170 diferentes tampões a 50 mM - Glicina-HCl (pH 2,4 - 3,6), acetato de Na (pH 3,6 -
171 5,0), Citrato-Na (pH 5,0 - 8,0), Tris-HCl (pH 6,0 - 8,0) e Glicina-NaOH (pH 8,0 -
172 10,0). A determinação da atividade xilanásica foi realizada como descrito
173 anteriormente. A estabilidade do pH foi medida, submetendo a enzima aos tampões
174 Glicina-HCl (pH 2,4 - 3,6), acetato de Na (pH 3,6 - 5,0), Citrato-Na (pH 5,0 - 8,0),
175 Tris-HCl (pH 6,0 - 8,0) antes de iniciar a reação enzimática. Alíquotas foram retiradas
176 para determinar a atividade xilanólítica em intervalos de tempo de 0 a 180 minutos e
177 alíquotas retiradas a cada 60 minutos [17].

178

179 **Efeito da temperatura na atividade enzimática e estabilidade à temperatura**

180 A temperatura ótima foi determinada através da realização da atividade
181 xilanásica em temperaturas que variaram de 30 a 100°C. Para avaliar a estabilidade
182 à temperatura, o extrato enzimático foi submetido previamente a diferentes
183 temperaturas (30 a 90°C), posteriormente alíquotas foram retiradas a cada 1 hora
184 para determinar a atividade xilanásica em intervalos de tempo de 0 a 180 minutos.

185 As amostras forma retiradas a cada 60 minutos e submetidas a determinações
186 analíticas [17].

187

188 **Efeito de íons metálicos e inibidores sobre a atividade da xilanase**

189 O grau de inibição ou potencialização de diferentes íons e substâncias sobre a
190 atividade da xilanase foi avaliado sujeitando-se o extrato enzimático a íons e
191 substâncias inibidoras durante 1 h, seguido da realização da atividade xilanásica. Os
192 íons utilizados foram Cu^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} a 1 e 5 mM e os
193 inibidores foram o EDTA e o 2-mercapetanol, nas mesmas molaridades [17].

194

195 **Simulação da digestão monogástrica**

196 O efeito da simulação no trato digestivo de monogástricos foi determinado *in*
197 *vitro*, como descrito por Boyce; Walsh [18], com algumas modificações. A atividade
198 de xilanase residual foi determinada após incubação (150 rpm e 39°C) da enzima
199 com (I) pepsina e HCl, pH 2,5 por 2 h (simulando a digestão gástrica), (II) extrato de
200 bile e pancreatina em pH 6,8 por 4 h (simulando a digestão intestinal), (III) tripisina
201 1% e ácido taurocólico por 4h (também simulando a digestão intestinal) e (IV)
202 pepsina, pH 2,5 por 2 h, seguido da incubação com extrato de bile e pancreatina em
203 pH 6,8 por 4 h (simulando a digestão completa no trato digestivo de monogástricos).

204

205 **Eletroforese e zimograma**

206 A eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo
207 com o método de Laemmli (1970) [19], utilizando gel de concentração a 4,9% e de
208 separação a 15,4%. Foram utilizadas as amostras da fermentação em biorreator de

209 acordo com as melhores condições e melhor rendimento de fermentação, numa
210 concentração de 100 e 200 mg mL⁻¹ de proteína. Os géis foram corados por duas
211 horas em solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 0,25% e descorados em
212 solução de metanol 45% e ácido acético 10%, até a visualização das bandas. A
213 massa molecular das bandas foi determinada através do software LabImage 1D
214 (Loccus Biotecnologia) utilizando-se como padrão de proteínas (GE healthcare),
215 fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica
216 (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-Lactalbumina (14,4 kDa).

217 O zimograma foi realizado em gel de poliacrilamida a 15,4%. As amostras
218 foram testadas numa concentração de 500mg e 1g L⁻¹; após a corrida o gel foi
219 lavado por 1h em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 1% de Tritom X-
220 100 e, em seguida, incubado no mesmo tampão sem o Triton X-100 por mais 1h.
221 Para a visualização da área de hidrólise, o gel foi corado com Vermelho Congo por
222 30 minutos e descorado em solução de NaCl por 30 minutos [20].

223

224 **Resultados e Discussões**

225 ***Fermentação em frascos***

226 *Aspergillus tamari* URM 4634 produziu xilanase em todos os ensaios do
227 planejamento fatorial 2⁴. Esta espécie já foi mencionada como uma produtora de
228 xilanase em outros estudos, porém, nenhum dos trabalhos cita a utilização da
229 fermentação extrativa [21, 22, 23].

230 Na Tabela 2 estão apresentados os resultados dos ensaios realizados e seus
231 respectivos valores de K_{PT} e K_X e o rendimento obtido pelas combinações entre as
232 variáveis estudadas. Ao analisar as variáveis independentes tendo o rendimento

233 como variável resposta, é evidente que as C_C e C_{PEG} têm um efeito significativo. A
234 Figura 1 mostra o gráfico de pareto representando os efeitos das variáveis
235 independentes e os efeitos das suas combinações, nele pode-se verificar que o
236 efeito das C_C e C_{PEG} foi negativo, o que significa que concentrações mais baixas
237 aumentam o rendimento da extração.

238 Sabe-se que quanto maior a MM_{PEG} , menores concentrações do polímero são
239 necessárias para a formação das fases [24]; no caso do PEG 6000, pode-se reduzir
240 suas concentrações, sem afetar a formação de fases. No entanto, a formação de
241 fases do sistema é facilitada com o aumento da concentração de polímero [24,25],
242 fator que é limitante ao diminuir as concentrações do polímero. Além disso, as
243 alterações nas concentrações do polímero pode alterar o k da molécula. Um
244 exemplo são os estudos de Schimidt et al. [26], que relatam uma diminuição de 3,2
245 vezes no k da α -amilase em função do aumento da C_{PEG} em um sistema
246 PEG/fosfato. Enquanto que em um sistema PEG 4000/fosfato uma concentração
247 aumentada de PEG de 14% a 20% resultou em um aumento de 5 vezes o valor do
248 coeficiente de partição da enzima. No caso da xilanase produzida por *A. tamarii*
249 URM 4634, a concentração do polímero não demonstrou efeitos significativos para
250 sua partição.

251 Ooi et al. [27] estudaram a produção de lipase por *Burkholderia pseudomallei*
252 através da fermentação extrativa, variando-se a C_{PEG} em 5 e 20% (p/p), e
253 observaram que o crescimento de células foi retardado em meios constituídos por
254 elevadas C_{PEG} . O aumento da C_{PEG} pode causar um aumento na viscosidade do
255 meio, o que dificulta a taxa de transferência de oxigênio, que por sua vez, afeta o
256 crescimento celular [28].

257 Em relação ao sal, Kuboi et al. [29] relataram que altas concentrações são
258 tóxicas para as células microbianas. Esse evento pode ser relacionado com a
259 pressão osmótica devido à desidratação das células em meio hipertônico. Por este
260 motivo, os sais muitas vezes não são considerados adequados para a composição
261 da fase inferior do sistema. No entanto, os estudos feitos por Ooi et al. [27] mostram
262 que o sistema formado por PEG/citrato de sódio (5% p/p) foi adequado para a
263 produção da enzima, com atividade lipásica e crescimento celular semelhantes à do
264 sistema constituído por PEG/dextrana. Para a produção da xilanase por *A. tamarii*
265 URM 4634, concentrações baixas foram melhores, mas a C_C utilizada ainda assim,
266 foi superior à utilizada para a produção de lipase citada [27], sem provocar danos ao
267 crescimento do fungo e à atividade da xilanase por ele produzida. O aumento da
268 concentração de sal pode também resultar em aumento da viscosidade do meio,
269 baixando assim o rendimento final da fermentação.

270 Com base nos resultados obtidos pela análise do planejamento fatorial 2^4 foi
271 elaborado um novo planejamento tendo como variáveis o citrato de sódio e o PEG
272 em concentrações mais baixas do que as anteriormente testados (Tabela 3). Como
273 MM_{PEG} nenhum efeito significativo foi observado, o PEG 6000 por fazer parte do
274 ensaio com maior rendimento (Ensaio 2, Tabela 2) foi escolhido para as etapas
275 seguintes de fermentação.

276 No gráfico de pareto representado na figura 2 observou-se o efeito causado
277 pela C_{PEG} e C_C , onde a primeira tem um efeito positivo significativo, já a C_C não foi
278 significativa para o rendimento da fermentação. Por esta razão, o sistema
279 constituído por 14% de PEG 6000 e 14% de citrato de sódio foi escolhido para as
280 etapas seguintes de fermentação.

281 Na cinética de produção, foi observado que o rendimento diminuiu ao longo
282 do tempo e que em 48 horas houve maior rendimento (Figura 3). O pH pouco mudou
283 ao longo do tempo, com variações entre pH 6,17 e 6,2. Até às 72 horas, o
284 coeficiente de partição visto para as proteínas (Figura 4), indica que estas moléculas
285 encontravam-se na fase de maior concentração do polímero (fase rica em PEG),
286 uma vez que este manteve-se acima de um, em contrapartida, o k_x foi mantido
287 abaixo de 1 neste mesmo tempo ($k=0,2$, a fermentação a 48h), indicando que a
288 enzima foi extraída para a fase rica em citrato de sódio. Resultados semelhantes
289 foram vistos no estudo da fosfatase alcalina [30] que teve o particionamento para a
290 fase rica em sal em um sistema constituído por 10% de PEG 6000 e de citrato de
291 sódio a 12,9%, com k semelhante à xilanase produzida pelo *A. tamarii* URM4634 ($K=$
292 0,26), porém após 96h houve uma inversão dos valores, mas a xilanase manteve-se
293 na fase oposta das outras proteínas.

294 **Fermentação em biorreator**

295 Em biorreator, a enzima se comportou semelhantemente à produzida em
296 frascos agitados com rendimento de 72% e atividade xilanásica de 331,4 U mL⁻¹;
297 porém a enzima manteve-se na fase inferior durante todo processo e apresentou
298 atividade xilanásica superior às encontradas em frascos agitados (141,0 U mL⁻¹).
299 Embora nenhum trabalho de produção de xilanases por fermentação extrativa em
300 SDFA tenha sido relatado, esse tipo de fermentação já é utilizado na produção de
301 outras enzimas como endoglucanase [11], fosfatase alcalina [30] e lipase [27; 31].
302 Parte destes estudos a escala de produção foi aumentada utilizando a fermentação
303 extrativa em biorreatores [31], os valores do k e o rendimento da fermentação foram

304 maiores do que os obtidos na fermentação em frascos agitados, provavelmente
305 devido a uma melhor homogeneidade na agitação do meio e aeração forçada.

306 Estes fatores podem permitir um melhor controle dos parâmetros do ambiente
307 fermentativo e um transporte mais eficiente de nutrientes, em especial oxigênio. Os
308 resultados sugerem que a agitação desempenha um papel crucial na fermentação
309 extrativa, principalmente na presença de uma elevada viscosidade. Isto é devido à
310 influência da agitação sobre a taxa de transferência de oxigênio, a concentração de
311 oxigênio dissolvido e de produção e recuperação de produtos [32].

312 O rendimento obtido pela fermentação extrativa em biorreatores foi
313 consideravelmente elevado (72%) quando comparado a outros valores, como o da
314 xilanase produzida por fermentação submersa em frascos agitados que atingiu
315 rendimento de 17,5% ao utilizar precipitação com sulfato de amônia e cromatografia
316 como métodos de purificação [33], com metodologia semelhante, outros autores
317 alcançaram um rendimento de 87% [34]. Um rendimento de 74,6% foi obtido por
318 precipitação com sulfato de amônia da xilanase produzida por *Aspergillus nidulans*
319 KK-99 [34]; com a aplicação de outras fases para a purificação da enzima, este
320 rendimento certamente iria diminuir, dados que corroboram com encontrados por Pal
321 e Khanum [35] que realizaram a purificação de xilanase produzida por *Aspergillus*
322 *niger* DFR-5 em três etapas, obtendo um rendimento de 81,92% na primeira etapa e
323 apenas 38,9% na última.

324 **Caracterização da xilanase produzida em biorreator**

325 A enzima caracterizada parcialmente foi produzida nas melhores condições
326 em biorreator. Em relação ao pH ótimo as maiores atividades foram observadas na
327 faixa de pH ácido, tendo o seu pH ótimo de 3,6 (Figura 5) em tampão de acetato de

328 sódio e a sua menor atividade em pH 7,5 em tampão Tris-HCl (61,4%). As xilanases
329 fúngicas mais relatadas na literatura são otimamente ativas em pH ácido (pH 4,5 a
330 6,5) ou neutro [5, 36-40], porém, ao contrário do observado neste trabalho, a
331 xilanase produzida por *Chaetomium* sp. CQ31 teve melhor atividade em pH 7,5 [33].

332 A estabilidade ao pH da enzima é essencial para caracterização enzimática,
333 antes da enzima ser explorada comercialmente. A xilanase produzida por *Aspergillus*
334 *tamaritii* URM 4634 mostrou-se estável ao pH, permanecendo ativa durante todo o
335 ensaio em todos os pHs testados, chegando aos 180 minutos de ensaio com
336 atividade residual superior aos 40% (Figura 6) e 97,18% em pH ótimo. Assim, a
337 estabilidade da xilanase em uma ampla gama de pH é uma característica
338 importante, que demonstra o seu potencial para possíveis aplicações industriais. A
339 xilanase produzida por *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 foi estável ao longo de uma
340 estreita faixa de pH 7,0-8,0 [41], enquanto que a produzida pelo *Thermomyces*
341 *lanuginosus* manteve-se acima de 95% da sua atividade entre pH 5,5 e 9,5 [42].
342 Além disso, a xilanase do *Aspergillus nidulans* manteve-se estável num intervalo de
343 pH de 3,5-10,0 após 4 h de incubação [43] e a xilanase produzida pelo *Aspergillus*
344 *niger* DFR-5 não foi estável ao pH tendo uma perda de atividade entre pH 4,0 a 6,5
345 [36].

346 Pode-se dizer que o efeito da temperatura sobre a atividade xilanásica foi
347 positivo, pois a atividade aumentou conforme a elevação da temperatura até 90 °C,
348 temperatura onde houve a maior atividade da xilanase, apenas reduzindo sua
349 atividade a 100°C. Para a maioria das xilanases fúngicas, as atividades ótimas são
350 em temperaturas entre 45 e 60°C [34, 40, 44 - 47]. Os resultados relatados por Jiang

351 et al. [33] corroboram com os obtidos pela xilanase produzida por *A. tamaritii*
352 URM4634, também com atividade ótima acima de 60°C.

353 A enzima mostrou-se estável à temperatura mantendo sua atividade a cima
354 de 50% aos 180 minutos de reação. Diferente do visto, a xilanase produzida pelo
355 *Chaetomium* sp., teve sua atividade relativa reduzida a zero aos 180 ° C depois de
356 30 minutos de reação [33]. A termoestabilidade enzimática envolve fatores ligados à
357 estabilidade termodinâmica e cinética e depende de interações moleculares como as
358 ligações de hidrogênio existentes, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ligações
359 dissulfeto e a existência de metais que podem promover uma estrutura
360 conformacional diferenciada para a enzima com uma maior eficiência estrutural,
361 reduzindo a entropia no desdobramento e na liberação de tensão [48, 49].

362 Na presença de íons metálicos e de substâncias inibidoras, a xilanase não
363 sofreu inibição do Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} (1mM) e do 2-mercaptoetanol, porém o
364 único íon a inibir a enzima de forma considerável foi o Mg^{2+} (5 mM), com inibição de
365 65% da atividade enzimática; a 1mM a inibição foi 10 vezes menor. Os outros íons e
366 o EDTA inibiram a enzima numa faixa que variou entre 1,8 e 12,7%. Estes valores
367 corroboram com o estudo de Jiang et al. [33], onde foi relatada ativação da xilanase
368 na presença de Cu^{2+} e pequenas alterações na presença de EDTA e 2-
369 mercaptoetanol, a 1 mM. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que na
370 ração animal se faz necessária, em algumas situações, a suplementação mineral; o
371 que não iria inibir a atividade da xilanase produzida por *Aspergillus tamaritii* URM
372 4634.

373 A xilanase se comportou positivamente sob a ação das enzimas digestórias
374 de animais monogástricos *in vitro*. Sua atividade *in vitro* mais baixa ficou em torno de

375 65% no ensaio gástrico (pepsina+HCL) e nos ensaios intestinais (pancreatina +
376 extrato de bile e da tripsina + ácido taurocólico) sua atividade ficou acima dos 70%.
377 Na simulação da digestão completa, a enzima foi ativada, com atividade xilanásica
378 de 106%. Esses resultados sugerem que a enzima ao ser aplicada em rações para
379 animais monogástricos terá pequenas perdas em sua atividade ou ainda será
380 potencializada, já que *In vivo*, a presença dos componentes da digesta pode
381 melhorar o desempenho da enzima [18].

382 Na imagem da eletroforese SDS-PAGE (Figura 9A), foram visualizadas
383 bandas contidas no extrato enzimático da fermentação extrativa com massas
384 moleculares variando entre 13,53 e 71,46 kDa. A área de hidrólise observada no
385 zimograma (Figura 9B) indica que o *Aspergillus tamaritii* URM 4634 produziu apenas
386 uma xilanase extracelular com massa molecular por volta de 19,08 kDa. Geralmente,
387 xilanases com peso molecular abaixo de 30 kDa são classificadas na família 11 das
388 glicosil-hidrolases e possuem um ponto isoelétrico alto [50], isso explicaria porque a
389 xilanase teve melhor atividade em pH ácido, pois em seu ponto isoelétrico, que deve
390 ser elevado, ela apresentaria menor solubilidade e menos interação com meio
391 dificultando sua atividade. O resultado encontrado é similar aos de autores que
392 identificaram xilanases com pesos de 17,5 e 23,0 kDa; 21 kDa e 26kd [34; 51; 52].

393

394 **Conclusão**

395 A fermentação extrativa com SDFA é efetiva na extração da enzima, obtendo-
396 se alto rendimento (72%) e ótimos resultados no escalonamento, mais que o dobro.
397 A xilanase produzida por *Aspergillus tamaritii* URM 4634 tem grande potencial para
398 indústria de rações para animais monogástricos, pois apresenta boa atividade

399 xilanásica e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura características muito
400 importantes na manipulação industrial. Além disso, a enzima não demonstrou
401 grandes modificações *in vitro* sob a influência de enzimas e sucos digestórios, com
402 portencialização de sua atividade na simulação da digestão completa (106%), sendo
403 indicada para suplementação de rações animais para monogástricos, melhorando
404 assim a energia metabolizável dos alimentos e conseqüentemente, aumentando a
405 conversão alimentar e produção animal.

406

407 **Agradecimentos**

408 Os autores agradecem à FACEPE, ao CNPq e à CAPES (PROCAD/NF 2009
409 Processo 0921/2010) pelo financiamento e incentivo à pesquisa.

410

411 **Referencias**

412 [1] Coughlan MP, Hazlewood GP. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems:
413 biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol Applied Biochem*
414 1993;17:259-289.

415

416 [2] Dekker RFH, Richards GN. Hemicellulases: their occurrence, purification,
417 properties, and mode of action. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1976;32:277-352.

418

419 [3] Bhat MK. Cellulases related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv*
420 2000;18:355-383.

421

- 422 [4] Alberton LR, Vandenberghe LPS, Assmann R, Fendrich RC, Rodríguez-León J,
423 Soccol CR. Xylanase Production by *Streptomyces viridosporus* T7A in Submerged
424 and Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Residues. Braz Arch Biol
425 Technol 2009;52:171-180.
- 426
- 427 [5] Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge, JA, Amorim DS.
428 Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. Appl Microbiol
429 Biotechnol 2005;67:577–591.
- 430
- 431 [6] Schügerl K, Hubbuch J. Integrated bioprocesses. Curr Opin Microbiol
432 2005;8(3):294-300.
- 433
- 434 [7] Hernández MS, Rodríguez MR, Guerra NP, Rosés RP. Amylase production by
435 *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. J Food
436 Process Eng 2006;73:93-100.
- 437
- 438 [8] Imelio N, Marini A, Spelzini D, Picó G, Farruggia B. Pepsin extraction from bovine
439 stomach using aqueous two-phase systems: molecular mechanism and influence of
440 homogenate mass and phase volume ratio. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed
441 Life Sci 2008;1;873(2):133-8.
- 442
- 443 [9] Boeris V, Romanini D, Farruggia B, Pico G. Purification of chymotrypsin from
444 bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte. Process
445 Biochem 2009;44:588-592.

446

447 [10] Paquet V, Myint M, Roque C, Soucaille P. Partitioning of pristnamycins in
448 aqueous two-phase systems: a first step toward the development of antibiotic
449 production by extractive fermentation. *Biotechnol. Bioeng* 1994;44:445–451.

450

451 [11] Sinha J, Dey PK, Panda T. Extractive fermentation for improved production of
452 endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei/Saccharomyces*
453 *cerevisiae* using aqueous two-phase system. *Biochem Engin J* 2000;6:163–175

454

455 [12] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
456 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*
457 1976;72:248-254.

458

459 [13] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of
460 xylanase activity. *J Biotechnol* 1992;23:257-270.

461

462 [14] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugars.
463 *Anal Chem* 1959;31(3):426-428.

464

465 [15] Ooi CW, Tey BT, Hii SL, Ariff A, Wu HS, Lan JCW, Juang RS, Kamal SMM, Ling
466 TC. Direct purification of *Burkholderia pseudomallei* lipase from fermentation broth
467 using aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 2009a;14:811–818.

468

469 [16] Ooi CW, Tey BT, Hii SL, Kamal SMM, Lan JCW, Ariff A, Ling TC. Purification of
470 lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt based aqueous two-
471 phase systems. *Process Biochem* 2009b;44:1083–1087.

472

473 [17] Moreira KA, Azenha ML, Teixeira MFS, Lima-Filho JL, PORTO ALF. Partition
474 behaviour and partial purification of alkaline protease from *Nocardioopsis* sp. in poly
475 (ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase systems. *Internet Jour Biotechnol*
476 *Biochem* 2005;01:22-32.

477

478 [18] Boyce A, Walsh G. Purification and characterisation of an acid phosphatase
479 with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *J Biotechnol* 2007;132:82–87.

480

481 [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
482 bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

483

484 [20] Mattéotti C, Bauwens J, Brasseur C, Tarayre C, Thonart P, Destain J, Francis F,
485 Haubruge E, Pauw ED, Portetelle D, Vandebol M. Identification and characterization
486 of a new xylanase from Gram-positive bacteria isolated from termite gut
487 (*Reticulitermes santonensis*). *Protein Expres Purifi* 2012; 83:117–127.

488

489 [21] Ferreira G, Boer CG, Peralta RM. Production of xylanolytic enzymes by
490 *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. *FEMS Microbiol* 1999;173:335-339.

491

492 [22] Souza DF, Souza CGM, Peralta RM. Effect of easily metabolizable sugars in the
493 production of xylanase by *Aspergillus tamaraii* in solid-state fermentation. Process
494 Biochem 2001;36:835–838.
495

496 [23] Gouda MK,. Abdel-Naby MA. Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus*
497 *tamaraii* xylanase. Microbiol. Res 2002;157:275–281.
498

499 [24] Albertsson PA. Partition of cell particles and macromolecules. New York: Wiley-
500 Interscience; 1986. p. 346.
501

502 [25] Asenjo JA, Andrews BA. Aqueous two-phase systems for protein separation: a
503 perspective. J Chromatogr A 2011;1218:8826.
504

505 [26] Schmidt AS, Venton AM, Asenjo J A. Partitioning and purification of α -amylase in
506 aqueous two-phase. Enzyme Microbiol Technol 1994;16:131-142.
507

508 [27] Ooi CW, Hii SL, Kamala SMM, Ariff A, Ling TC. Extractive fermentation using
509 aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular
510 lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. Process Biochem 2011;46:68–73.
511

512 [28] Qing Q, Yang B, Wyman CE. Impact of surfactants on pretreatment of corn
513 stover. Bioresour. Technol 2010;101:5941–5951.
514

- 515 [29] Kuboi R, Maruki T, Tanaka H, Komasa I. Fermentation of *Bacillus subtilis*
516 ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-
517 phase systems. J Ferment Bioeng 1994;78:431–6.
- 518
- 519 [30] Pandey SK, Banik RM. Extractive fermentation for enhanced production of
520 alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-
521 phase systems. Bioresour Technol 2011;102:4226–4231.
- 522
- 523 [31] Show P L, Tan CP, Anuar MS, Ariff A, Yusof YA, Chen SK, Ling TC. Extractive
524 fermentation for improved production and recovery of lipase derived from
525 *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase
526 systems. Bioresour Technol 2012;116:226–233.
- 527
- 528 [32] Cheng HC, Wang FS. Optimal biocompatible solvent design for a two-stage
529 extractive fermentation process with cell recycling. Comput Chem Eng
530 2008;32:1385–1396.
- 531
- 532 [33] Jiang Z, Cong Q, Yan Qb, Kumar N, Dub X. Characterisation of a thermostable
533 xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. Food
534 Chem 2010;120:457–462.
- 535
- 536 [34] Bajaj BK, Manhas K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus*
537 *licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. Biocatal Agric
538 Biotechnology 2012;1:330–337

539

540 [35] Taneja K, Gupta S, Kuhad RC. Properties and application of a partially purified
541 alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour*
542 *Technol* 2002;85:39–42.

543

544 [36] Pal A, Khanum F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5:
545 Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process*
546 *Biochem* 2011;46:879–887.

547

548 [37] Gandhi JP, Rao KK, Dave PJ. Characterization of extracellular thermostable
549 xylanase from *Chaetomium globosum*. *J Chem Technol Biotechnol* 1994;60(1):55–
550 60.

551

552 [38] Ganju RK, Vithayathil PJ, Murthy SK. Purification and characterization of two
553 xylanases from *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*. *Can J Microbiol*
554 1989;35:836–842.

555

556 [39] Mäntylä A, Paloheimo M, Hakola S, Lindberg E, Leskinen S, Kallio J, et al.
557 Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium*
558 *thermophilum*: A recombinant thermoxyylanase for biobleaching of kraft pulp. *Appl*
559 *Microbiol Biotechnol* 2007;76(2):377–386.

560

561 [40] Lu FX, Lu M, Lu ZX, Bie XM, Zhao HZ, Wang Y. Purification and characterization
562 of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresour Technol* 2008;99(13):5938–
563 5941.

564 [41] Khandeparkar RDS, Bhosle NB. Isolation, purification and characterization of the
565 xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid state
566 fermentation. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:732–42.

567

568 [42] Singh S, Pillay B, Prior BA. Thermal stability of -xylanases produced by different
569 *Thermomyces lanuginosus* strains. *Enzyme Microb Technol* 2000;26: 502–8.

570

571 [43] Reis DS, Costa MAF, Peralta RM. Xylanase produced by a wild strain of
572 *Aspergillus nidulans*. *Acta Sci: Biol Sci* 2003;25(1):221–5.

573

574 [44] Salles BC, Cunha RB, Fontes W, Sousa MV, Filho EXF. Purification and
575 characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *J Biotechnol*
576 2000;81:199–204.

577

578 [45] Sandrim VC, Rizzatti ACS, Terenzi HF, Jorge JA, Milagres AMF, Polizeli MLTM.
579 Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by
580 *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem*
581 2005;40(5):1823–1828.

582

583 [46] Sapre MP, Jha H, Patil MB. Purification and characterization of a thermostable-
584 cellulase free xylanase from *Syncephalastrum racemosum* ohn. J Gen Appl
585 Microbiol 2005;51(6):327–334.
586

587 [47] Dutta T, Sengupta R, Sahoo R, Sinha RS, Bhattacharjee A, Ghosh S. A novel
588 cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*:
589 Production, purification and characterization. Lett Appl Microbiol 2007;44(2):206–
590 211.
591

592 [48] Li WF, Zhou XX, Lu P. Structural features of thermozymes. Biotechnol Adv
593 2005;23:271–281.
594

595 [49] Bajaj BK, Sharma P. Analkali-thermotolerant extracellular protease from a newly
596 isolated *Streptomyces* sp. DP2. New Biotechnol 2011;28:725–732.
597

598 [50] Chantasingh D, Pootanakit K, Champreda V, Kanokratana P, Eurwilaichitr L.
599 Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus*
600 (BCC129) in *Pichia pastoris*. Protein Express Purifi 2006; 46:143–149.
601

602 [51] He J, Chena D, Yua B, Zhanga K. Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-
603 1,4-beta-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris*. Bioch Eng J 2010;52:
604 1–6.
605

606 [52] Hmida-Sayari A, Taktek S, Elgharbi F, Bejar S. Biochemical characterization,
607 cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11
608 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. Process Biochem
609 2012;47: 1839-1847.

610

611 **Legendas das figuras**

612 **Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável resposta o
613 rendimento da fermentação. Planejamento fatorial 2^4 .

614 **Figura 2.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável resposta o
615 rendimento da fermentação. Planejamento fatorial 2^2 .

616 **Figura 3.** Curva de rendimento da fermentação ao longo do tempo.

617 **Figura 4.** Curva dos coeficientes de partição da proteína (♦) e da xilanase (■) e
618 Curva de pH (●).

619 **Figura 5.** Curva de pH ótimo da xilanase produzida por *Aspergillus tamarii* URM
620 4634. (♦) Tampão Glicina-HCl (pH 2,4, 3,0 e 3,6), (●) Tampão Acetato - Na (pH 3,6,
621 4,0, 4,5 e 5,0), (▲) Tampão Citrato-Na (pH 5,0, 5,5, 6,0, 7,0 e 8,0), (■) Tampão Tris-
622 HCl (pH 6,0, 7,0, 7,5 e 8,0) e (x) Glicine-NaOH (pH 8,0, 9,0 e 10,0).

623 **Figura 6.** Curva de estabilidade ao pH da xilanase produzida por *Aspergillus tamarii*
624 URM 4634 após 180 minutos de ensaio. (♦) Tampão Glicina-HCl (pH 2,4, 3,0 e 3,6), (■),
625 Tampão Acetato-Na (pH 3,6, 4,0, 4,5 e 5,0), (▲) Tampão Citrato-Na (pH 5,0, 5,5,
626 6,0, 7,0 e 8,0) e (x) Tampão Tris-HCl (pH 6,0, 7,0, 7,5, e 8,0).

627 **Figura 7.** Curva de temperature ótima da xilanase produzida por *Aspergillus tamarii*
628 URM 4634.

629 **Figura 8.** Curva de estabilidade à temperature da xilanase produzida por *Aspergillus*
630 *tamarii* URM 4634 após 180 minutos de ensaio.

631 **Figura 9.** (A) Perfil eletroforético da enzima produzida por *Aspergillus tamarii* URM
632 4634 presente na fase sal da fermentação extrativa. (B) Atividade xilanásica
633 demonstrada no zimograma. (1) Coluna com proteínas padrões. (2) Coluna com a
634 amostra.

635

636 Tabelas

637

638 **Tabela 1.** Matriz do planejamento estatístico 2^4 da fermentação em Sistema de Duas
639 Fases Aquosas PEG/citrato.

Variáveis	Inferior	Central	Superior
$MM_{PEG}(\text{g mol}^{-1})$	2000	4000	6000
$C_{PEG}(\%)$	15	20	25
pH	6	7	8
$C_C(\%)$	15	20	25

640 Onde: MM_{PEG} é a Massa Molar do Polietilenoglicol; C_{PEG} é a concentração do
641 ploetilenoglicol e C_C é a concentração do citrato.

642

643

644

645 **Tabela 2.** Resultados do planejamento 2⁴ para a produção de xilanase utilizando
 646 fermentação extrativa em SDFA por *Aspergillus tamari* URM 4634

Ensaio	Fatores experimentais				<i>K_{pt}</i>	<i>K_x</i>	<i>Y</i>
	<i>MM_{PEG}</i>	<i>C_{PEG}</i>	pH	<i>C_C</i>			
1	2000	15	6	15	8,48	0,19	95,2
2	6000	15	6	15	7,20	0,14	96,5
3	2000	25	6	15	5,85	0,12	89,8
4	6000	25	6	15	1,05	1,89	32,7
5	2000	15	8	15	1,41	0,12	89,3
6	6000	15	8	15	3,08	0,16	86,2
7	2000	25	8	15	0,91	0,55	71,8
8	6000	25	8	15	0,90	0,77	64,4
9	2000	15	6	25	1,72	3,21	35,6
10	6000	15	6	25	1,28	0,15	94,0
11	2000	25	6	25	2,57	2,98	25,1
12	6000	25	6	25	0,49	2,27	36,4
13	2000	15	8	25	3,47	1,00	80,0
14	6000	15	8	25	2,01	3,98	20,0
15	2000	25	8	25	1,04	1,51	49,9
16	6000	25	8	25	5,96	2,93	32,9
17	4000	20	7	20	10,37	0,47	62,9
18	4000	20	7	20	9,90	0,55	62,5
19	4000	20	7	20	10,38	0,89	62,7
20	4000	20	7	20	8,21	0,66	64,2

647

648 Onde: MM_{PEG} é a Massa Molar do Polietilenoglicol; C_{PEG} é a concentração do
649 ploetilenoglicol; C_C é a concentração do citrato, K_{pt} é o coeficiente de partição das
650 proteínas; K_X é o coeficiente de partição da xilanase e Y é o rendimento da
651 fermentação.

652

653

654

655

656 **Tabela 3.** Matriz do planejamento estatístico 2^2 da fermentação em Sistema de Duas
657 Fases Aquosa PEG/citrato.

Variáveis	Inferior	Central	Superior
% PEG	12	13	14
%CITRATO	12	13	14

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669 **Tabela 4.** Inibição das xilanases na presença de íons metais e inibidores.

Substâncias	Atividade Residual	Inibição	Atividade Residual	Inibição	Desvio
	(1 mM)	(%)	(5 mM)	(%)	Padrão (±)
* Controle +	100,0	-----	100,0	-----	0
Cu ²⁺	103,4	0	104,7	0	1,56
Mn ²⁺	155,5	0	156,6	0	0,497
Na ⁺	85,7	14,3	91,8	8,2	3,08
Fe ²⁺	100,2	0	98,2	1,8	3,51
Zn ²⁺	96,2	3,8	87,3	12,7	0,67
Mg ²⁺	93,5	6,5	34,6	65,4	1,76
Ca ²⁺	101,1	0	93,1	6,9	0,07
EDTA	94,3	5,7	90,9	9,1	0,92
2-Mercaptoetanol	100,0	0	127,0	0	1,12

670 * O controle foi realizado ao testar a atividade xilanásica normalmente, ou seja, sem
 671 a adição de íons ou substâncias inibidoras.

672

673

674

675

676

677

678

679

680 **Tabela 5.** Efeito da digestão monogástrica *in vitro* na atividade da xilanase produzida
681 por *Aspergillus tamaritii* URM 4634

Ensaio	Atividade Total Xilanase (U mL⁻¹)	Atividade Total Controle (U mL⁻¹)	Atividade Residual da Xilanase (%)	Desvio Padrão (±)
1	13,66	20,96	65	0,986
2	15,50	20,96	74	1,079
3	16,30	20,96	78	0,536
4	13,68	12,96	106	0,835

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

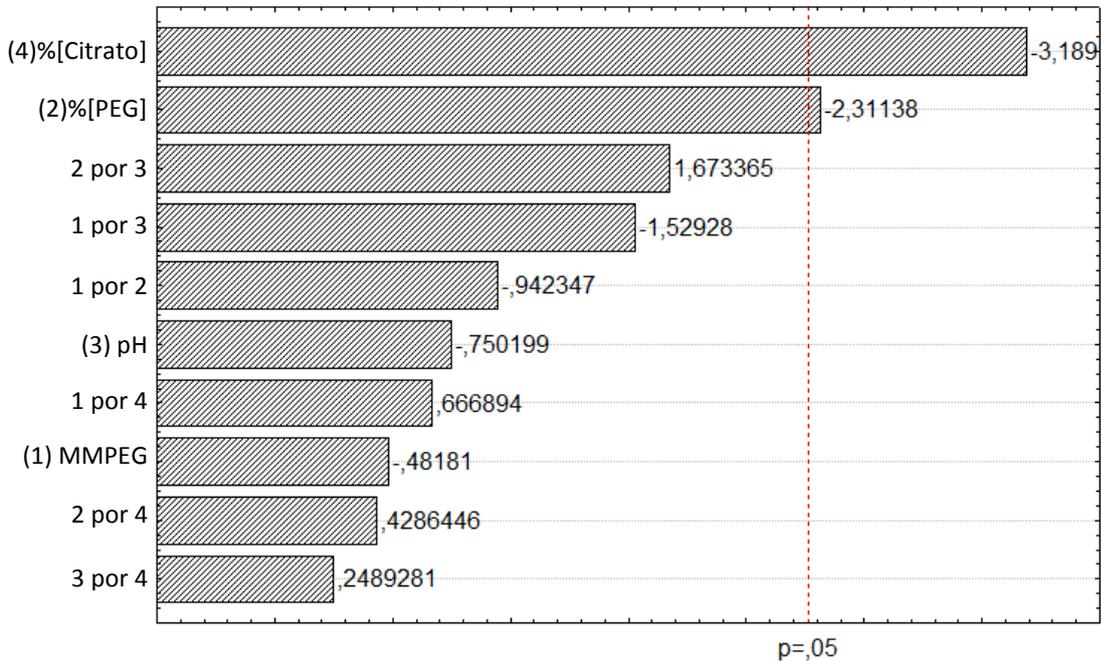
693

694

695

696 **Figuras**

697

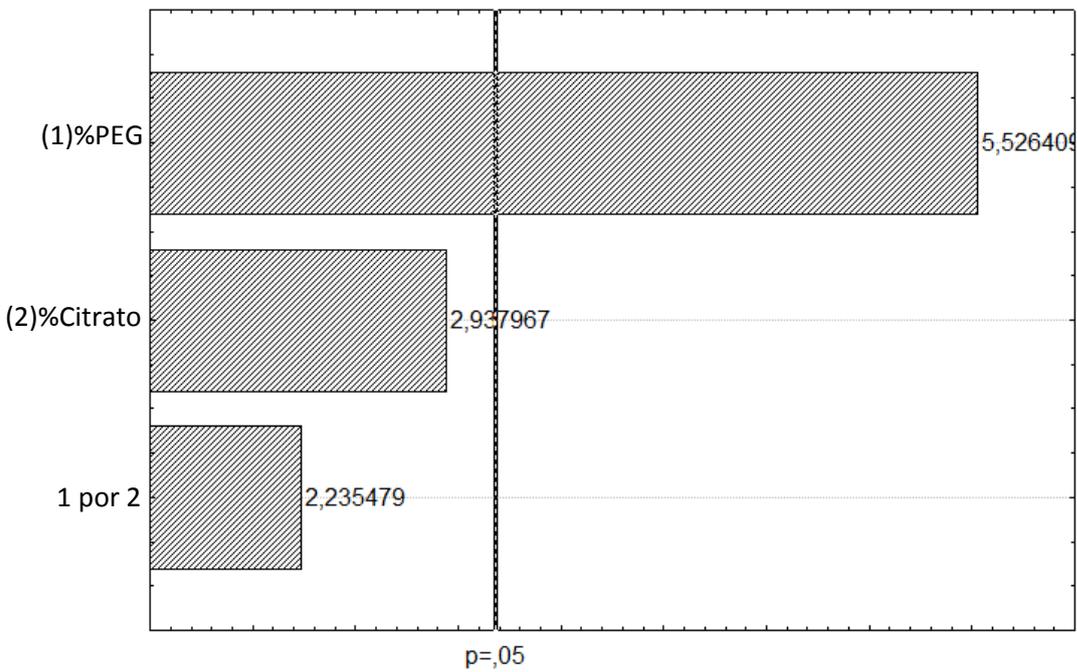


698

Figura 1

699

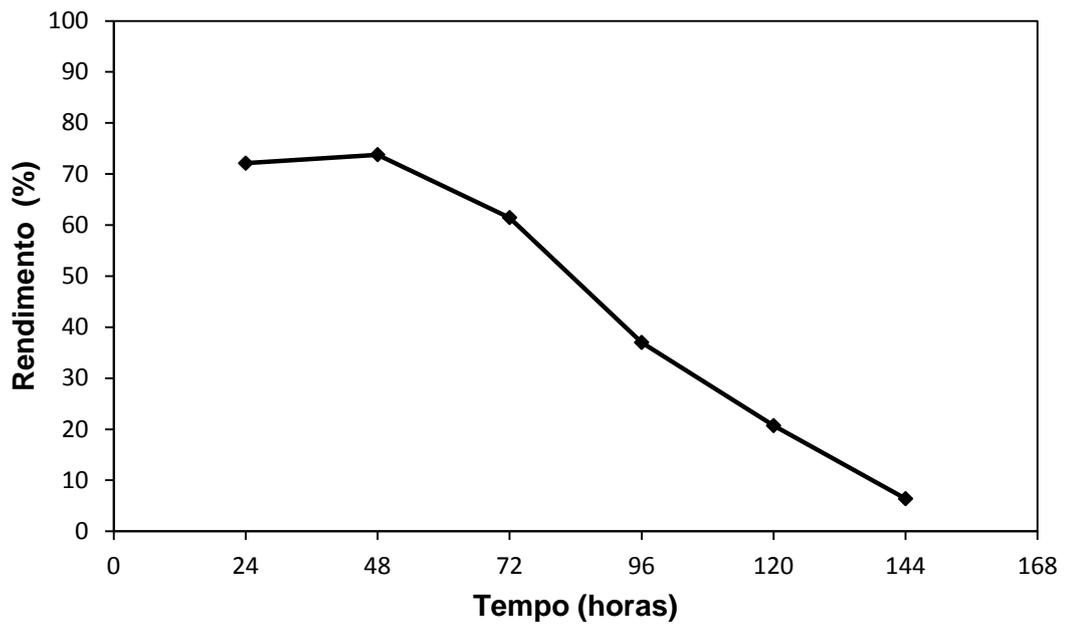
700



701

Figura 2

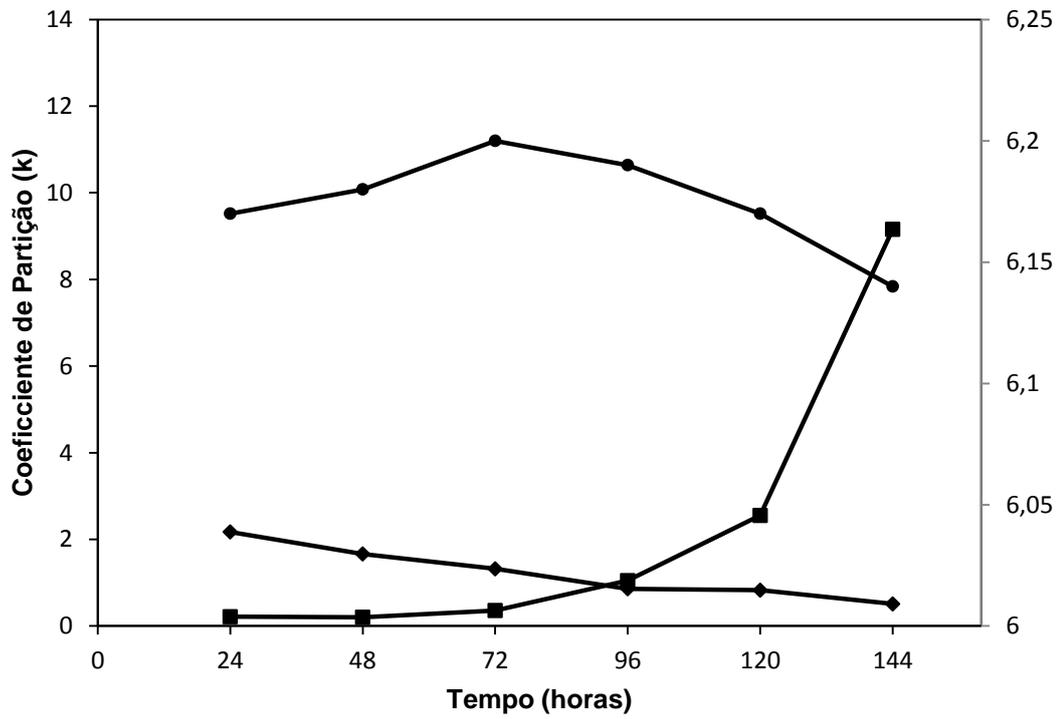
702



703

704

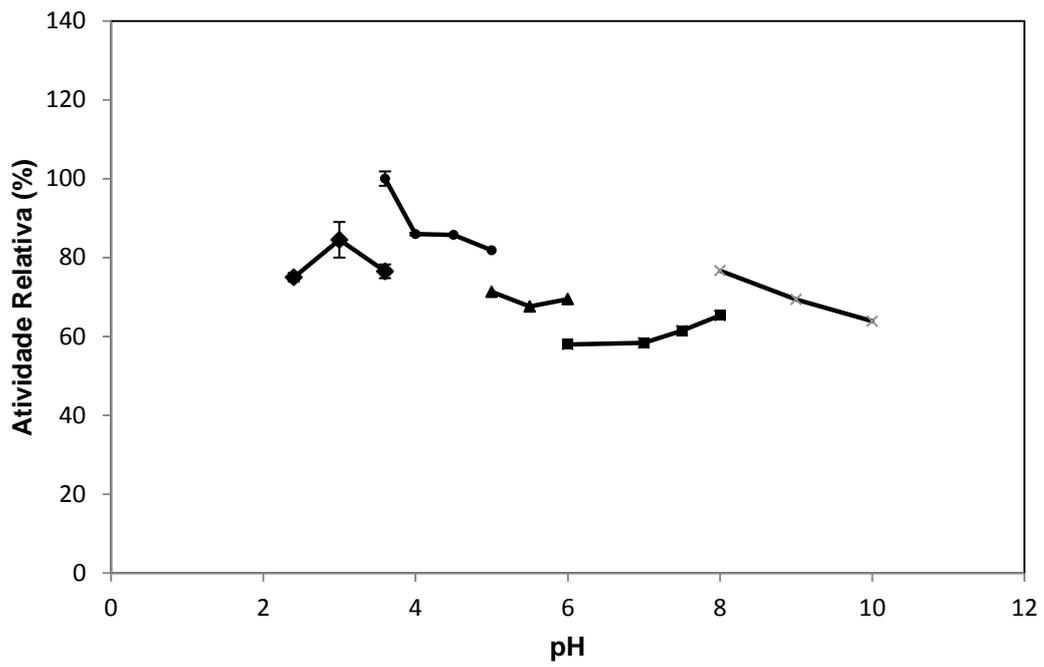
Figura 3



705

706

Figura 4



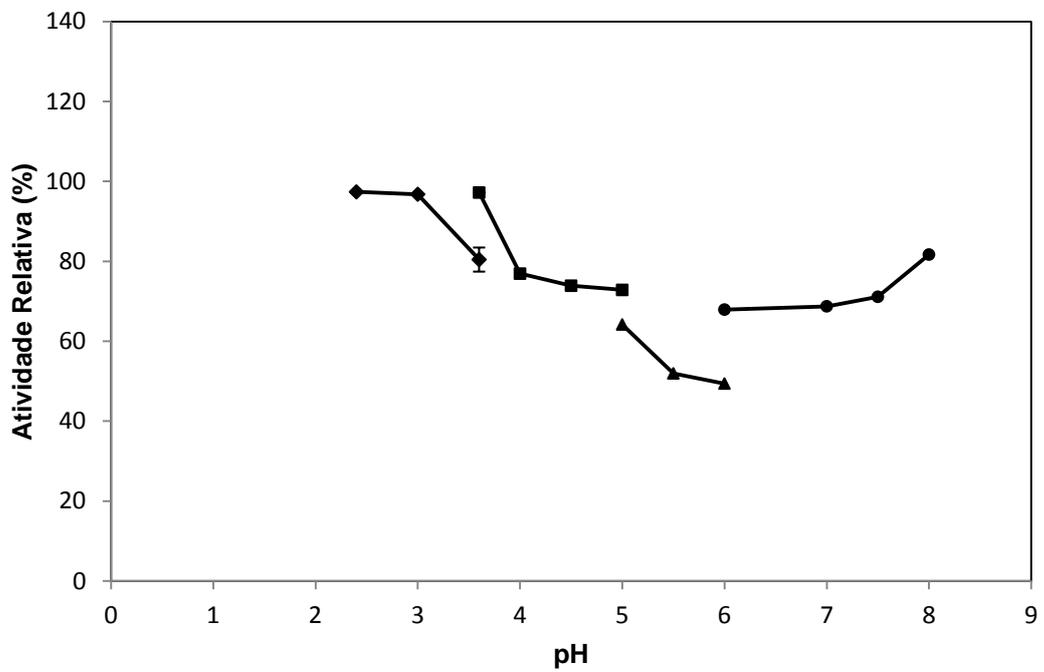
707

708

Figura 5

709

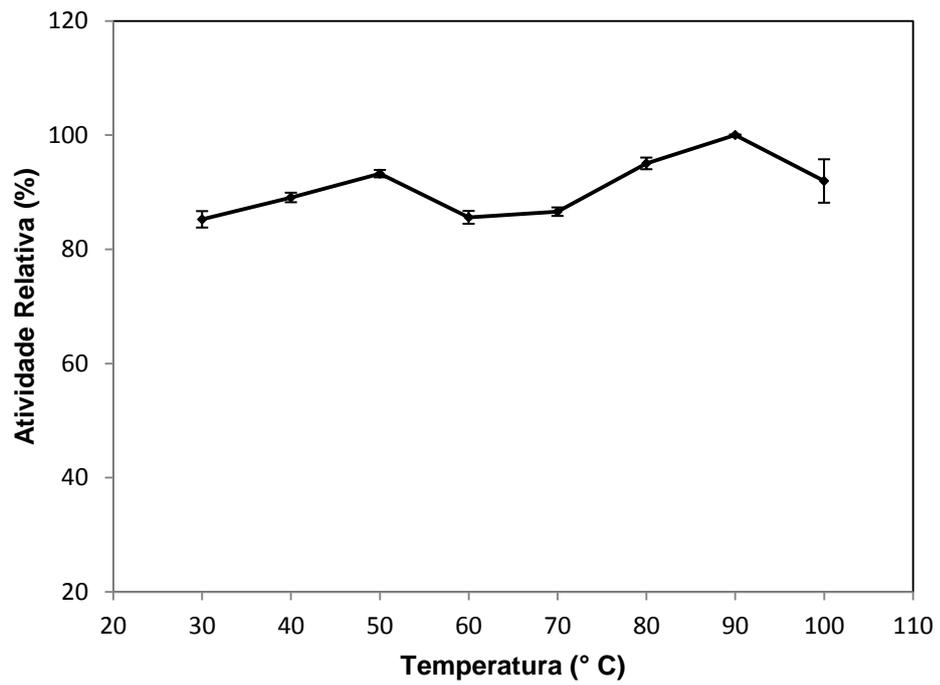
710



711

712

Figura 6



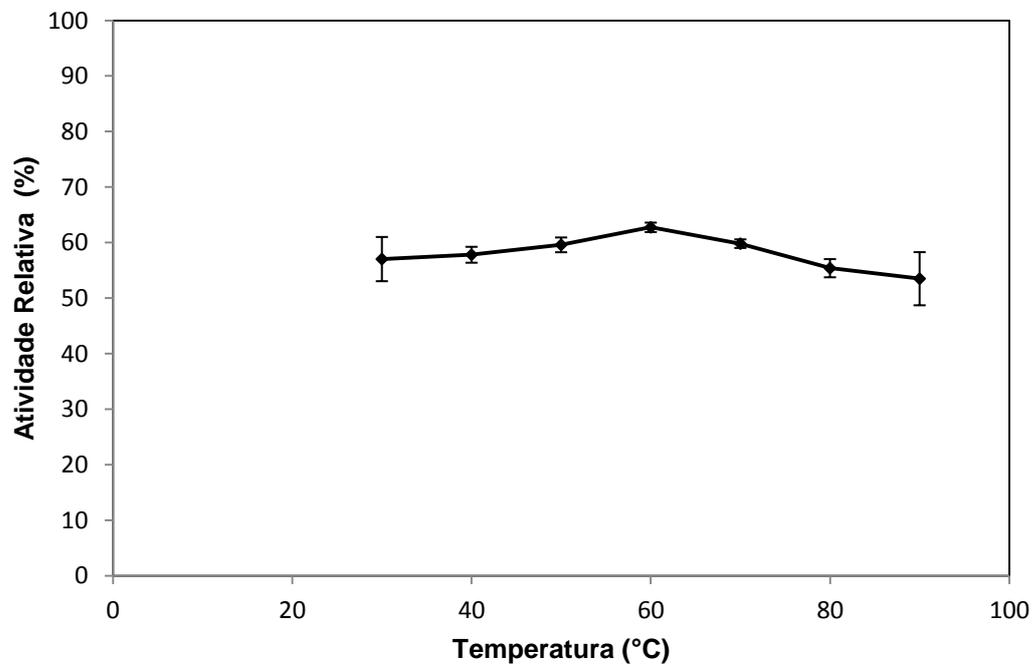
713

714

715

716

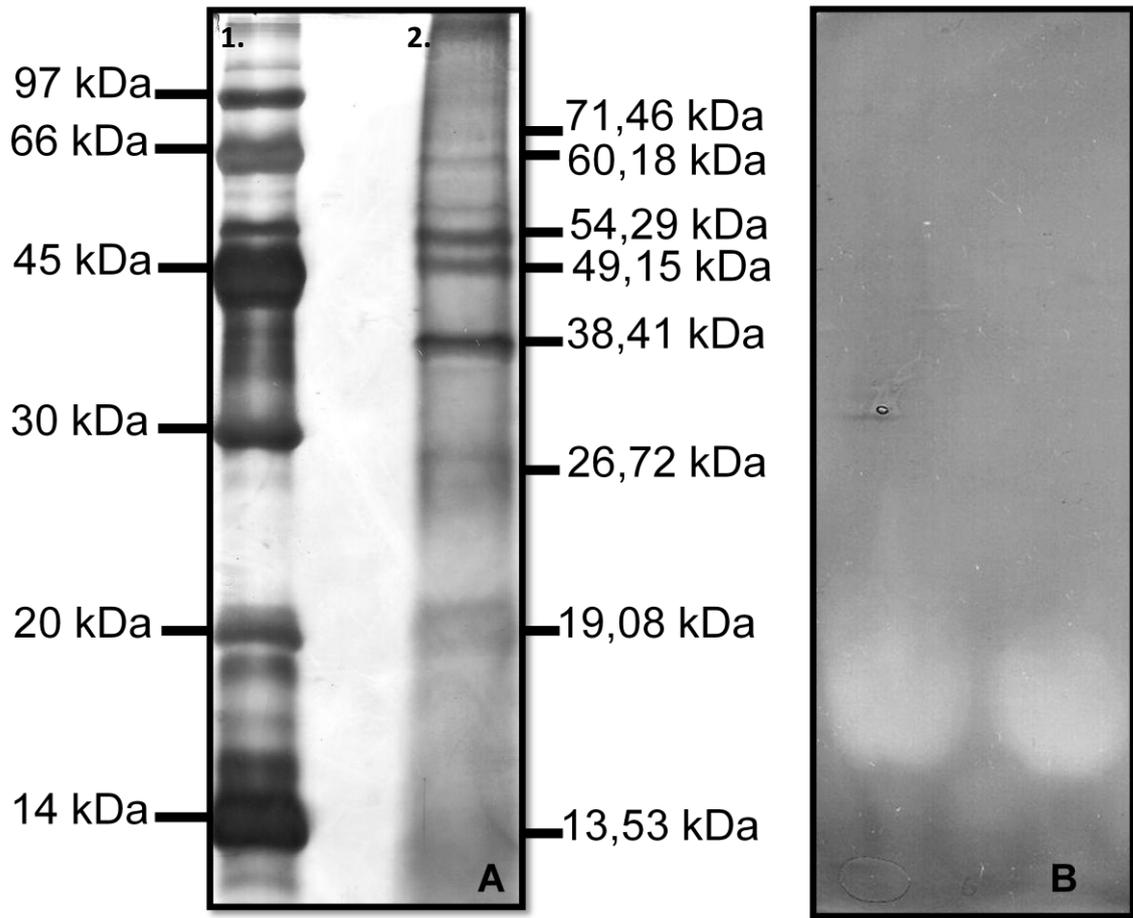
Figura 7



717

718

Figura 8



719

720

Figura 9