

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DO ISOLAMENTO DA XILANA DA CASCA DE ARROZ E DE
SEU DESDOBRAMENTO POR XILANASES FÚNGICAS

LÍCIA VASCONCELOS MARTINS
FARMACÊUTICA

ORIENTADOR : PROF. DR. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

1.975

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

Página

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 XILANA	3
2.2 XILANASE	9
3. MATERIAL	15
3.1 PARA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA XILANA	15
3.1.1 Equipamentos	15
3.1.2 Reagentes	15
3.1.3 Vidraria	15
3.2 PARA OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DA XILANASE	15
3.2.1 Linhagens de fungos usadas	15
3.2.2 Equipamentos	16
3.2.3 Reagentes	16
3.2.4 Vidraria	16
4. MÉTODOS	17
4.1 PARA OBTENÇÃO DA XILANA (SUBSTRATO)	17
4.1.1 Amostragem	17
4.1.2 Extração	17
4.1.3 Identificação do produto (xilana) obtido...	17
4.1.4 Determinação do resíduo mineral fixo (cin- zas) total, solúvel em água e solúvel em HCl(1:9)	19
4.1.5 Purificação parcial da xilana bruta	19
4.1.6 Extração da xilana diretamente da casca in- tegral	19
4.2 PARA OBTENÇÃO DA XILANASE (ENZIMA)	19
4.2.1 Obtenção dos fungos usados para a produção de xilanase	19

4.2.2	Manutenção da cultura fúngica	20
4.2.3	Produção da xilanase propriamente dita	20
4.2.4	Medida da atividade enzimática	21
4.2.5	Definição da unidade de atividade enzimá - tica.....	23
4.2.6	Extração da enzima e sua purificação.....	23
4.2.7	Determinação da atividade específica da xi- lanase	24
4.2.8	Comportamento eletroforético da xilanase...	25
4.2.9	Estudo das propriedades da reação enzimá - tica	26
5.	RESULTADOS	27
5.1	EXTRAÇÃO DA XILANA BRUTA	27
5.2	DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO DA XILANA BRU- TA (CINZAS) E DA ALCALINIDADE DAS CINZAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM ÁGUA	28
5.3	PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XILANA BRUTA EXTRAÍDA DA CASCA DE ARKÖZ	28
5.4	EXTRAÇÃO DA XILANA BRUTA POR PROCESSO MAIS ECONÔMI- CO (DIRETO)	29
5.5	DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS) DA XILANA BRUTA OBTIDA EM 5.4, E DA ALCALINIDADE DAS CINZAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM ÁGUA.....	29
5.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES, EX- PRESSOS EM XILOSE, PRODUZIDOS POR HIDRÓLISE DA XILA- NA.....	30
5.7	PRODUÇÃO DE XILANASE PELO FUNGO <u>GEOTRICHUM SP</u>	31
5.8	PURIFICAÇÃO DA XILANASE PRODUZIDA PELA CULTURA DE <u>GEOTRICHUM SP</u>	32
5.9	PRODUÇÃO DE XILANASE PELOS FUNGOS <u>GEOTRICHUM SP</u> , <u>ASPERGILLUS SP</u> (COR VERDE ESCURA) E <u>ASPERGILLUS SP</u> (COR VERDE CLARA).....	33
5.10	FRACIONAMENTO DA XILANASE PRODUZIDA PELA CULTURA DE <u>ASPERGILLUS SP</u> (COR VERDE CLARA)	34
5.11	ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DIRETA DA XILANASE PRODUZI- DA PELO FUNGO <u>ASPERGILLUS SP</u> (COR VERDE CLARA) COM SULFATO DE AMÔNIO A 80% DE SATURAÇÃO.....	36

5.12	ESTUDO DA EFETIVIDADE DE DIVERSOS AGENTES PRECIPITANTES PARA O ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS XILANASES DO <u>ASPERGILLUS SP</u> (COR VERDE CLARA).....	37
5.13	RESULTADOS DO ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DA XILANASE.....	39
5.13.1	Influência do pH	39
5.13.2	Influência da concentração do substrato.	40
5.13.3	Influência da concentração da fração enzimática precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação	41
5.13.4	Influência da temperatura	42
5.13.5	Influência do tempo de incubação	43
5.13.6	Comportamento eletroforético das xilanases produzidas por <u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara).....	44
5.13.7	Comportamento eletroforético das xilanases produzidas por <u>Geotrichum sp</u> contaminado com <u>Penicillium sp</u>	45
6.	DISCUSSÃO.....	46
6.1	EXTRAÇÃO DA XILANA DA CASCA DE ARROZ.....	46
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA XILANA BRUTA QUANTO AO RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS).....	46
6.3	PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XILANA BRUTA EXTRAÍDA DA CASCA DE ARROZ	47
6.4	HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DA XILANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	47
6.5	PRODUÇÃO DA XILANASE PELOS FUNGOS	48
6.6	PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS	48
6.7	ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DA XILANASE ...	49
6.7.1	Influência do pH	49
6.7.2	Influência da concentração do substrato..	49
6.7.3	Influência da concentração da enzima	50
6.7.4	Influência da temperatura	50
6.7.5	Influência do tempo de incubação.....	50
6.8	COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO	51

7. CONCLUSÕES.....	52
BIBLIOGRAFIA	55

QUADROS E FIGURAS

QUADROS

QUADRO 1 : Porcentagens de holocelulose e de xilana bruta obtidas.....	27
QUADRO 2 : Porcentagens de cinzas totais, solúveis e insolúveis e das alcalinidades existentes na xilana bruta do quadro 1.....	28
QUADRO 3 : Porcentagens de cinzas totais, solúveis e insolúveis e das alcalinidades existentes na xilana bruta extraída pelo processo direto.....	29
QUADRO 4 : Porcentagens de glicídeos redutores expressos em xilose fornecidos pelas xilanas de arroz e de madeira de iariço.....	30
QUADRO 5 : Atividade da xilanase em extrato de <u>Geotrichum sp</u> , cultivado em diferentes condições	31
QUADRO 6 : Purificação parcial da xilanase produzida pelo <u>Geotrichum sp</u>	32
QUADRO 7 : Ensaio de xilanase em extrato de <u>Geotrichum sp</u> , de <u>Aspergillus sp</u> (cor verde escura) e de <u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara).....	34
QUADRO 8 : Purificação parcial da xilanase do <u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara).....	35
QUADRO 9 : Purificação parcial da xilanase do <u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara) proveniente da precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ a 80% de saturação.....	36
QUADRO 10: Purificação parcial da xilanase do <u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara) usando diferentes agentes precipitantes	38

FIGURAS

FIGURA 1 : Curva padrão de xilose	22
FIGURA 2 : Curva padrão para o cálculo de proteínas.....	25
FIGURA 3 : Influência do pH na atividade da fração precipi- tada com sulfato de amônio a 80% de saturação..	39
FIGURA 4 : Influência da concentração do substrato na ati- vidade da fração precipitada com sulfato de amô- nio a 80% de saturação.....	40
FIGURA 5 : Influência da concentração da fração enzimática precipitada com sulfato de amônio a 80% de sa- turação.....	41
FIGURA 6 : Influência da temperatura na atividade da fra- ção precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.....	42
FIGURA 7 : Influência do tempo de incubação na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.....	43
FIGURA 8 : Comportamento eletroforético em gel de poliacri- lamida das frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de satura- ção do caldo enzimático produzido por <u>Aspergil-</u> <u>lus sp</u> (cor verde clara).....	44
FIGURA 9 : Comportamento eletroforético em gel de poliacri- lamida das frações oriundas das precipitações a 40 , 60 e 80% de saturação com sulfato de amô- nio das preparações do fungo <u>Geotrichum sp</u> con- taminado com <u>Penicillium sp</u>	45

DEDICATÓRIA

A meus pais

A meus filhos :

Paulo

Patrícia

Com especial carinho e agradecimentos a meu esposo Paulo.

AGRADECIMENTOS

Aos que direta ou indiretamente concorreram para a realização deste trabalho, externamos os mais sinceros agradecimentos, e de modo especial :

à Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade concedida ;

à Universidade Federal de Goiás e a seus dirigentes, particularmente do Instituto de Patologia Tropical, da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Ciências Biológicas, que proporcionaram recursos financeiros para a realização do curso ;

ao Conselho Nacional de Pesquisas, pela bolsa de estudos concedida ;

ao Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da U.F.Go. que cedeu os laboratórios, equipamentos e reagentes indispensáveis às pesquisas experimentais ;

ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelo fornecimento da cultura do fungo Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp usado neste trabalho, bem como pelo livre acesso à biblioteca da aquele Instituto ;

ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela segura orientação ;

à Profa. Hilary Castle de Menezes, pela cooperação, compreensão e boa vontade com que sempre nos distinguiu ;

ao Prof. Dr. José Salum, pelas excelentes sugestões dadas ;

à Profa. Cristina Gusman Guilardi pelo estímulo e apoio constantes ;

ao Dr. Mário Barreto Figueiredo, do Instituto Biológico de São Paulo, pela classificação dos fungos usados ;

aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas, pela compreensão e amizade.

RESUMO

A xilana foi extraída da casca de arroz em meio alcalino após a eliminação das substâncias solúveis em água e em solventes orgânicos, e a redução do teor de lignina. Foi precipitada em meio ácido, centrifugada, lavada, liofilizada e pesada.

O material obtido foi caracterizado quanto ao poder redutor e pelo cromatograma de seu hidrolisado, comparando-se com padrão. Sua purificação parcial foi feita por reprecipitações e diálise, de terminando-se o resíduo mineral fixo na xilana bruta.

Obteve-se 7,4g% de xilana bruta e 6,6 g% após a purificação.

Usou-se também um método simplificado de extração, obtendo-se 20,0g% de xilana bruta.

A enzima (xilanasase) foi obtida de preparações fúngicas mantidas em meio sólido adequado e cultivadas em meio líquido. Após obtenção do extrato bruto (solução enzimática), as enzimas foram fracionadas por precipitação com sulfato de amônio, dialisadas e liofilizadas.

A atividade específica das frações precipitadas com 40, 60 e 80% de saturação foram 35,53; 4,04 e 2,97 respectivamente, para o Geotrichum sp e 14,65; 25,54 e 19,09 respectivamente, para o precipitado do extrato de Aspergillus sp (cor verde clara). As porcentagens da atividade total de enzimas precipitadas foram 40,86; 2,89 e 1,55 para o Geotrichum sp e 18,22; 13,76 e 5,96 para o Aspergillus sp, respectivamente.

O precipitado total, a 80% de saturação com sulfato de amônio, apresentou uma atividade específica de 93,36. A porcentagem da atividade total das enzimas, precipitada com 80% de saturação de sulfato de amônio foi de 42,15.

O estudo das propriedades eletroforéticas das enzimas produzidas pelo Aspergillus sp precipitadas com sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação mostrou que elas possuíam 3 componentes sendo que as enzimas produzidas pelo Geotrichum sp precipitadas com sulfato de amônio a 40 e 60% de saturação possuíam 5 componentes e o material proveniente da precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação possuía 4 componentes.

A produção de xilanase foi maior após o 16º, 20º e 27º dia de incubação para o Geotrichum sp; 15º, 19º e 27º dia para o Aspergillus sp (cor verde clara); 13º, 19º e 28º dia para o Aspergillus sp (cor verde escura).

Usou-se a xilana semi-purificada extraída da casca de arroz como substrato e a xilanase produzida pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara), precipitada com 80% de saturação de sulfato de amônio e com 93,36 de atividade específica, para estudo das reações e propriedades enzimáticas.

As melhores condições encontradas para a atividade da enzima sobre a xilana extraída foram: pH 7,8; temperatura entre 50 e 55°C; concentração de substrato 0,8g%.

O estudo de caracterização do produto da reação enzimática mostrou que a enzima estudada não produz xilose a partir da xilana e sim, oligossacarídeos. Portanto, a hidrólise completa da xilana, necessitaria também de um outro sistema enzimático específico para a hidrólise de oligossacarídeos.

SUMMARY

Xylan was extracted from rice husk in alkaline solution after the elimination of substances soluble in water and in organic solvents and the reduction of lignin content. It was precipitated in acid solution, centrifuged, washed, lyophilized and weighed.

The substance obtained was characterized according to the reducing power and chromatogram of its hydrolysate, comparing them with the standard product. Its partial purification was accomplished through reprecipitation and dialysis, determining the mineral residue contained in the raw xylan.

By this procedure were obtained 7.4g% of raw xylan and 6.6 g% after a partial purification. A simplified method was also used and 20.0 g% of xylan was extracted.

The enzyme (xylanase) was obtained from fungal preparations maintained in an adequate solid medium and cultivated in a liquid medium.

After obtaining the raw extract (enzymatic solution) the enzymes were fractionated by precipitation with ammonium sulphate, dialysed and lyophilized. The specific activity of the fractions precipitated with a solution of ammonium sulphate of 40, 60 and 80% saturation were 35.53; 4.04 and 2.97 respectively for the Geotrichum sp, and 14.65; 25.54 and 19.09 respectively for the precipitate from Aspergillus sp (of light green color) extract. The percentages of total activity of the precipitated enzyme were 40.86; 2.89 and 1.55 for the Geotrichum sp and 18.22; 13.76 and 5.96 for the Aspergillus sp respectively.

The total precipitate of 80% ammonium sulphate saturation had a specific activity of 93.36 and accounted for 42.15 % of the original total activity in the extract of the Aspergillus sp (of light green color).

The study of electrophoretic properties of the enzyme produced by Aspergillus sp precipitated with a solution of ammonium sulphate of 40, 60 and 80% saturation showed that this precipitate had 3 components whereas that produced by Geotrichum sp had 5 components in the precipitate and 4 components in the material precipitated

with ammonium sulphate of 80% saturation.

The production of xylanase was greatest on the 16th, 20th and 27th day following the incubation, for the *Geotrichum* sp ; 15th, 19th and 27th day for the *Aspergillus* sp (of light green color); 13th, 19th and 28th day for the *Aspergillus* sp (of dark green color).

For the study of the xylanase properties of *Aspergillus* sp (light green color) it was used partial purified xylan from rice husk as substrate and, the precipitate of 80% saturation of ammonium sulphate, with a specific activity of 93.36 as source of enzyme.

The best conditions for the activity of the enzyme in relation to the xylan extracted were: pH 7.8; temperature between 50 and 55°C; concentration of substrate 0.8 g%.

Chromatographic study of the product of the reaction showed that this *Aspergillus* preparation does not produce xylose, but instead, oligosaccharides as end product.

For complete hydrolysis of the xylan to xylose, some enzyme specific for the hydrolysis of oligosaccharides should be added to the system.

1. INTRODUÇÃO

Para a melhoria da qualidade das condições de vida, há necessidade do desenvolvimento da tecnologia, particularmente da tecnologia relacionada com a exploração dos produtos naturais.

A necessidade de substituir a sacarina, tem levado os pesquisadores a se dedicarem aos estudos relacionados ao xilitol, substância de alto poder edulcorante.

O referido poliálcool pode ser obtido por redução (química ou enzimática) da xilose constituinte fundamental da xilana, admitindo-se a viabilidade de sua obtenção por esta via em escala industrial. Pelo fornecimento de xilose, xilitol, furfural e outros derivados, atualmente a xilana se reveste de importância, justificando as tentativas de sua extração visando produção comercial.

A extração da xilana tem sido feita utilizando-se apenas madeira e sabugo de milho, embora se saiba que ela é abundantemente encontrada no reino vegetal, acompanhando a celulose.

Conquanto haja na literatura (20) citações esparsas sobre presença de xilana em resíduos vegetais, não se encontrou nenhuma referência relacionada à metodologia de sua extração da casca de arroz nem à quantidade nela existente.

A produção de celulose a partir da casca de arroz integral é indesejável pela vitrificação apresentada, sendo esta propriedade atribuída à presença da xilana. A extração da xilana possibilitaria, portanto, a produção da celulose a partir do resíduo da extração. A deficiência mundial de celulose tem provocado transtornos que afetam diversos setores das indústrias nacionais e internacionais.

As xilanases pela capacidade que têm de desdobrar a xilana em oligossacarídeos (mais solúveis) e à xilose, têm encontrado aplicação na clarificação de sucos de frutas (32) e poderia ser aplicada em rações como acontece no produto comercial "Panase" (41), que, contendo celulasas melhora a digestibilidade dos carboidratos indigeríveis.

O presente trabalho teve como objetivos:

1) - estudo da extração e da dosagem quantitativa da xilana da casca de arroz, visando um melhor aproveitamento deste resíduo in

dustrial, produzido em grande quantidade em nosso País;

2) - estudar a produção de enzimas (xilanases) em condições de laboratório, por algumas linhagens de fungos isoladas desses resíduos;

3) - estudar as melhores condições para o desdobramento da xilana da casca de arroz, por enzimas produzidas pelos fungos;

4) - verificar a possibilidade de produção econômica de xilose a partir da xilana da casca de arroz, por processo enzimático.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. - XILANA

Xilana é um polissacarídeo que ocorre em quase todos os vegetais e é formada em maior parte de unidades de D-xilose, que podem estar ligadas a unidade ou unidades de L-arabinose ou ácido D-glicurônico. O nome xilana lhe foi atribuído pelos primeiros pesquisadores que a estudaram, pensando ser a xilose o único produto fornecido na sua hidrólise.

A xilana pode ser situada em 3 classes gerais de polissacarídeos : pentosanas, glicanas e hemicelulose. É classificada como uma pentosana por ser principalmente um polímero de pentose, sendo a mais abundante das pentosanas; é classificada como glicana porque é quase inteiramente um polímero de açúcar ou açúcares não modificados; mas, é classificada mais frequentemente como hemicelulose por ser o constituinte mais importante daquele polissacarídeo (54).

Há, porém, vários tipos de xilanas, que variam de acordo com sua procedência (53).

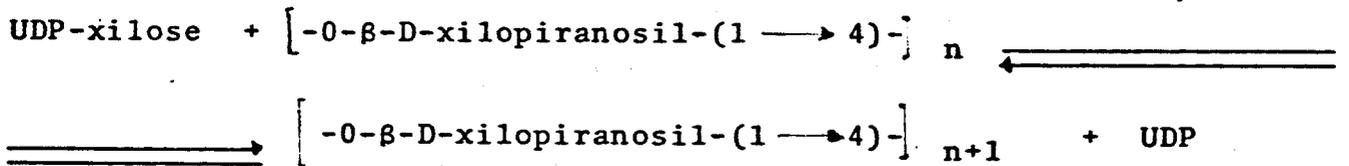
A xilana ocorre em, praticamente, todos os vegetais terrestres e em algas marinhas. Situa-se logo após a celulose e o amido em distribuição e abundância na natureza. É mais abundante em resíduos da agricultura, tais como madeira, sabugo de milho, fibras, caules, etc.

Nos caules são encontradas em quantidades que variam de 15 a 30%; madeiras duras contêm de 20 a 25% de xilana e madeiras moles contêm de 7 a 12%. Na primavera as madeiras contêm mais pentosanas do que no verão. Fibras vegetais como juta, sisal e similares contêm de 5 a 20% de xilana, não se sabendo como ela está ligada à estrutura celular. Há experiências que evidenciam uma combinação química entre celulose e xilana (54).

Xilanas verdadeiras (puras) são relativamente raras e são encontradas em algumas algas como a Rhodymenia palmata, que contém 80 % de ligações β -D(1 \rightarrow 4) e 20% de ligações β -D(1 \rightarrow 3) (20). Consequentemente, há estudos sobre estruturas de paredes celulares não celulosídicas em algas (23).

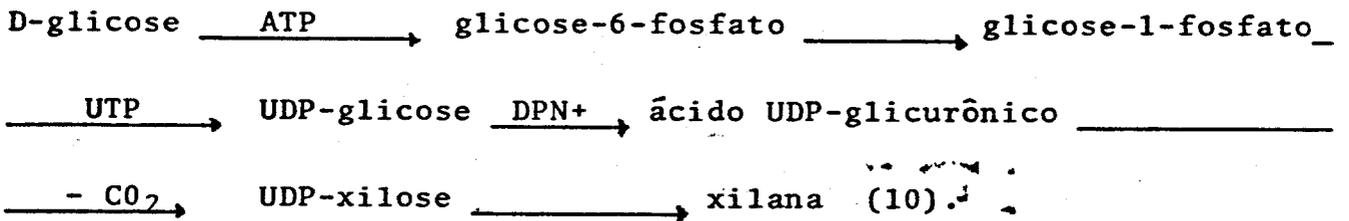
A origem e a função das xilanas ainda não foram de todo esclarecidas. Há teorias que mencionam ser a xilana um plastificante ou uma reserva alimentar mas, ainda sem confirmação. Quanto a origem, há maiores evidências de que a xilana é depositada juntamente com a celulose na elaboração da parede celular (54).

A xilana também pode ser sintetizada a partir de UDP-xilose através da ação catalítica de uma preparação enzimática dos brotos do as pargo (Asparagus officinalis), correspondendo à equação:



A UDP-xilose pode ser formada da reação da D-xilose-1-fosfato e UTP ou, mais comumente, por descarboxilação do ácido UDP-glicurônico, que é encontrado em vegetais.

A biossíntese da xilana a partir da D-glicose obedece ao seguinte esquema:



As xilanas purificadas são obtidas como pós brancos e amorfos, fortemente higroscópicos. Entretanto, foram obtidas xilanas cristalinas da palha da cevada e do vidoeiro (53). Foram feitos estudos sobre diagramas de raios x e micrografia eletrônica para melhor caracterização desses cristais (43).

A xilana é insolúvel em água e solúvel em soluções alcalinas, preferencialmente, em concentrações de 2 a 16% (54,15).

Há informes na literatura que relatam até 80% de solubilidade em ácido perclórico 5M (9).

Sua rotação ótica específica se situa entre -78 e -109° a 20°C em meio alcalino e concentrações de 2 a 4% (15).

A xilana carboximetilada é solúvel em água (28).

Determinações baseadas na pressão osmótica indicaram graus de polimerização de 113 a 150. Pela medida da viscosidade da dimetilxilana em m-cresol, foi calculado um grau de polimerização de 75 a 80 (54).

Estudos da viscosidade em solução cúprica-amoniaca deram um valor de 5×10^{-4} para a constante de Staudinger semelhante à celulose, sugerindo a linearidade das moléculas da xilana (54).

Seu peso molecular está entre 10.000 e 30.000 (15,53).

É facilmente hidrolisada em meio ácido, sendo que em ácido clorídrico ocorre também decomposição a furfural. Apresentam predominância de ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e $\beta(1 \rightarrow 3)$.

Estudos realizados em xilana metilada concluíram que sua cadeia é em sua maior parte linear, apresentando poucas ramificações (54).

Também foi observado que, quanto à distribuição dos substituintes, se constatava que a hidroxila do carbono-3 se tornava duas vezes mais reativa após a metilação da hidroxila do carbono-2 (14).

Foram feitas análises de cromatografia em fase líquido-gasosa para interpretação das conformações moleculares dos produtos hidrolisados da xilana metilada, provenientes de madeira dura. Os picos observados variaram com a quantidade dos produtos hidrolisados, possibilitando medir os estágios da hidrólise e a efetividade da mesma (44).

A xilana é oxidada com facilidade pelo periodato, adquirindo alto poder ótico-rotatório (54). Estudos sobre a degradação deste produto revelaram predominância de ácidos como o glicólico e o lático que foram separados por resina de troca iônica sendo posteriormente analisados por cromatografia (49). Também se efetuaram estudos sobre as propriedades da xilana oxidada pelo periodato, com estimação dos grupos alfa glicol (8).

A xilana exibe variações consideráveis em sua constituição embora todas possuam basicamente ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ de xilopiranosose. As variações que predominam na natureza são, o número e o modo das ligações de outros resíduos de açúcares nas partes laterais da cadeia (54).

O estudo da constituição da xilana do abeto da Noruega (Picea excelsa) demonstraram ser ela formada por unidades de xilose unidas em

ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e ácido D-glicurônico. Cada quinto resíduo, em média, carregava na terminal um resíduo de ácido glicurônico ligado através do carbono-2 (3).

A xilana da parede celular de pera é constituída de unidades de xilose possuindo resíduos de ácido D-glicurônico ligados à sua cadeia, sendo isenta de resíduos de arabinose. A xilana de asparto é formada, exclusivamente, de unidades de D-xilopirranose (12).

A alga Rhodymenia palmata também apresenta xilana exclusivamente formada de unidades de D-xilopirranose, sendo que, 80% das ligações são $\beta(1 \rightarrow 4)$ e os outros 20% são $\beta(1 \rightarrow 3)$, (38).

A xilana da faia contém cadeias laterais de ácido glicurônico ligadas ao carbono-2 das unidades de xilose (3).

O lariço (Larix laricina) contém em sua xilana arabinose, xilose e ácido urônico na proporção de 1:17:3, sendo homogênea quando examinada por eletroforese e sedimentação (1).

A xilana da palha do trigo contém 40 unidades de xilopirranose, as quais estão ligadas a 5 unidades de L-arabinofuranose e 3 unidades de ácido D-glicurônico (55).

No sabugo de milho a xilana contém além de unidades de D-xilose, ácido urônico, sendo essencialmente linear (55). Estudos mais minuciosos desta xilana verificaram que ela possuía 2,9% de ácido urônico; rotação óptica específica a 25°C de -116 (concentração 1% em NaOH 1N); cinzas 0,45 g%; peso molecular determinado pela dispersão da luz de 34.500 e grau de polimerização 261 (51).

A xilana pode ser obtida de numerosas plantas por extração alcalina. Estudos sobre o comportamento das xilanas mostraram boa estabilidade em meio alcalino (50). Certo grau de degradação foi verificado em algumas pentosanas extraídas com álcalis (4), também observados na xilobiase e xilotriose (5).

Este polissacarídeo foi obtido sinteticamente por polimerização da D-xilose a 140°C na presença de ácido fosforoso, apresentando estruturas altamente ramificadas e desordenadas que indicam grande complexidade (17).

A purificação pode ser feita por redissolução e reprecipitação seguida de diálise (54). Também, por tratamento pelo reagente de Fehling (solução de Fehling A + solução de Fehling B em iguais volumes)

com decantação após precipitação, suspensão do precipitado em água e adição de HCl 1N, adição de etanol e posterior recuperação da xilana. A acidificação e lavagem com etanol é repetida até a obtenção de um produto branco. Após o que, dialisa-se até se eliminar todo o cloreto; liofiliza-se e assim se obtém um produto contendo 75 a 80% de xilana (2).

O diacetato de xilana é um de seus derivados obtido pelo tratamento do polissacarídeo com anidrido acético entre 140 e 150°C ou por esterificação na presença de piridina a 70°C ou por ação do cloreto de acetila a 50°C.

A nitração ocorre por tratamento com ácido nítrico ou mistura de ácido nítrico, fosfórico e sulfúrico.

Outros ésteres, tais como o benzoil, podem ser obtidos tratando a xilana por cloretos apropriados na presença de NaOH, KOH ou piridina.

Sua hidrólise ácida ou enzimática fornece xilose, xilo-oligosacarídeos, xilitol por redução da xilose e furfural (54).

Há vários estudos sobre hidrólise enzimática da xilana com estudo da cinética de algumas enzimas.

Grande número de organismos, entre os quais fungos, bactérias e moluscos, decompõem a xilana (54).

Algumas plantas possuem enzimas que também são capazes de hidrolisar a xilana (51).

Xilana pura não é empregada na indústria; entretanto, as xilanas cruas ou pentosanas são de importância industrial. Seu uso foi proposto na área têxtil, mas ainda não é empregada nesse setor. O seu maior uso é na produção de furfural o qual tem muitas aplicações. É ainda aplicada na obtenção de outros derivados do furano. Grandes quantidades de furfural são usadas na purificação de produtos extraídos do petróleo, atualmente.

Uma série de reações permitem a conversão do furfural a ácido adípico e diamina-hexametileno, ingredientes básicos na síntese do nylon.

A xilana é usada na obtenção de D-xilose por hidrólise ácida ou enzimática. Em pequenas quantidades, a xilana é empregada na fabricação de papel, para redução de sua polpa ou espessura, diminuindo -

lhe o tempo de mistura e dando-lhe uma maior resistênciã à rutura .

Sua presença em alta concentração proporciona uma aparênciã vítreã, indesejãvel ao papel, sendo que estudos mais recentes atribuem esta propriedade aos poliuronídeos presentes (54)

Uma série de oligossacarídeos entre os quais xilobiõse, xilotriõse, xilotetraõse e outros podem ser isolados da xilana por hidrõlise, sendo usados em laboratõrio, como reagentes (52).

Amplas possibilidades se abrem quanto ao uso futuro da xilana para fornecimento de xilitol, adoçante que poderã substituir a sacarina tanto do ponto de vista medicinal quanto do dietético.

2.2. - XILANASE

Xilanases são enzimas que catalizam a hidrólise da xilana. Conhecem-se 3 tipos de xilanases, a saber:

3.2.1.32 - Nome sistemático: β -1,3-Xilana 3-xilana hidrolase; nome comum recomendado : 1,3-Xilanase. Hidrolisa ligações $\beta(1 \rightarrow 3)$ da xilana (18) sendo que essas enzimas não são encontradas em fungos (34).

3.2.1.8 - Nome sistemático : β -1,4-Xilana xilana hidrolase; nome comum recomendado: Xilanase. Hidrolisa ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ de xilana de uma maneira desorganizada, produzindo grandes quantidades de oligossacarídeos, mas pouca xilose (25).

3.2.1.37 - Nome sistemático : β -D-Xilosídeo xilohidrolase; nome comum recomendado: β -Xilosidase, xilobiase, que degrada a xilana lentamente, mas atuando sobre os xilo-oligossacarídeos nos fornece a xilose (19).

Os números se referem à classificação dada pela Comissão Internacional de Enzimas (19) designando a classe das hidrolases, sub-classe de glicosil e sub-sub-classe hidrolase de glicosídeos.

As xilanases são encontradas em plantas, invertebrados, fungos e bactérias (51). Sua função nos microrganismos e invertebrados é a promoção do metabolismo intermediário da xilana para estabelecimento do ciclo energético, aproveitando-a como fonte de carboidrato. Não se encontraram referências sobre propriedades gerais das xilanases, porque, as propriedades físico-químicas dessas enzimas foram estudadas, particularmente, relacionadas as suas origens.

Foram realizados estudos sobre xilanase cristalina obtida de um meio contendo Bacillus sp, que hidrolisava a xilana à xilobiase e outros oligossacarídeos sem produção perceptível de xilose (31).

Determinação do peso molecular por filtração em gel de várias frações de xilanase do Coniophora cerebela deram valores situados entre 34.000 e 38.000 (35).

Estudos sobre a capacidade hidrolítica do Chaetomium globosum, Streptomyces e Micromonospora, mostraram que, pelo menos duas enzimas atuavam na hidrólise da xilana. Uma exoenzima capaz de atuar nas cadeias xilosídicas com 3 ou mais unidades de xilose liberando-a

e outra, endoenzima capaz de romper a xilobiase mostrando que a especificidade depende do tamanho da molécula ou do comprimento da cadeia do substrato (45).

O Bacillus alkalophilic N° C-59-2 isolado do solo produziu xilanase, num meio alcalino, considerada uma endo-enzima que foi inibida por Hg, Ag e Cd. A ação dessa enzima produziu xilobiase e oligossacarídeos maiores, sem produção detectável de xilose. O estudo das propriedades físicas desta enzima mostrou uma constante de sedimentação a pH 8,0 de 3,5 S; ponto isoelétrico em pH 6,3. O espectro no ultra violeta mostrou uma absorção típica de proteína, sendo que a relação de absorbância entre 280 e 260 nm foi cerca de 1,7, sugerindo a ausência de ácido nucleico (27).

A xilanase produzida pelo fungo Aspergillus foetidus hidrolisou a xilana em xilobiase e xilo-oligossacarídeos sem produzir xilose em quantidade detectável. Um extrato do micélio deste fungo foi separado em resina de troca iônica, fornecendo duas frações. Uma destas hidrolisou a xilana à xilo-oligossacarídeos em quantidades insignificantes, com predominância de xilose. A outra fração hidrolisou a xilana produzindo uma mistura de D-xilose e xilo-oligossacarídeos (51).

Estudos sobre xilanase produzida por Aspergillus batatae e Aspergillus oryzae mostraram que o primeiro possuía atividade de sacarificação com um limite de degradação de 70%. O segundo apresentava atividade de liquefação sobre a xilana com um limite de degradação de 90%. Isto sugere possibilidades de uso de sistemas combinados de enzimas, o que possibilita converter cerca de 90% de xilana em xilose (21).

A xilanase é obtida por fermentação de microrganismos em meio adequado contendo xilana que induz a produção de xilanase de acordo com várias informações (26,29,34,42).

Vários fungos possuem capacidade de produzir a xilanase, entre os quais são citados: Aspergillus foetidus, Aspergillus oryzae, Aspergillus batatae, Penicillium chrysogenum, Trichoderma viridae, Piricularia oryzae, os pertencentes aos gêneros Chaetomium, Schyzophyllum, Trametes, Echinodontium, Alternaria, Cepharosporium, Cercospora, Glomerella, Marcosporium, sendo que entre estes o Chaeto-

mium trilaterale linhagem nº 2264 foi o mais ativo produtor de xilana_{se}, a qual decompõe a xilana completamente, produzindo xilose como produto final (33).

Entre 64 linhagens de fungos isolados de esterco de curral, pertencentes ao gênero Streptomyces, a espécie Streptomyces xylophagus apresentou maior habilidade para produção de xilanase (30), sendo que estudos mais minuciosos sobre esta enzima permitiram concluir que:

a) Entre os carboidratos testados como fonte de carbono apenas a xilana era efetiva para indução de xilanase, atingindo o máximo de rendimento quando adicionada em uma concentração de 1%.

b) O pH do caldo influenciou a produção, sendo melhor entre 8,2 a 8,5; em valores de pH inferiores a 7,0 houve diminuição da produção enzimática.

c) O extrato de levedura não foi efetivo para a produção da enzima.

d) A adição de cálcio e magnésio em baixos níveis aumentaram a produção de xilanase inibindo-a em níveis mais altos (34).

Outras 38 linhagens de Streptomyces provenientes de outras fontes foram estudadas, e as espécies albogriseolus e olivarens, embora produtoras de xilanase, apresentavam produção inferior a espécie xylophagus (30).

Além de 480 linhagens de fungos filamentosos, também foram testados quanto à produção de xilanase as linhagens de Chaetomium, Schy zophyllum, Trametes, Echinodontium, Alternaria, Cepharosporium, Cercospora, Gibberella, Glomerella e Macrosporium que produziram enzima. Destes o Chaetomium trilaterale 2264 foi considerado excelente produtor (30).

O fungo Sclerotium rolfsii também produziu xilanase após incubação de 10 dias a 30°C em meio controlado (18).

Embora outros fungos também tenham sido estudados, constatando-se a produção de xilanase, a conclusão geral a respeito dessas enzimas, quanto à capacidade de hidrólise da xilana diz respeito a sua atuação. Assim, algumas são consideradas hábeis para hidrolisar a xilana à xilose enquanto que outras produzem apenas xilobiose ou xilo-oligossacarídeos (33).

Essas enzimas também podem ser obtidas através de bactérias produtoras de xilanase. Estudos sobre as bactérias das espécies Succinivibrio dextrinsolvens, Bacteroides succinogenes e Butyrivibrio fibrisolvens permitiram verificar que elas fermentavam rapidamente a xilana à xilose, dando o ácido lático como produto intermediário (11).

As bactérias do rume produzem xilanase e entre elas foram isoladas as espécies Bacteroides amylogenes e Butyrivibrio, cujas enzimas produziram a partir da xilana principalmente xilobiase, além de pequenas quantidades de outros oligossacarídeos. Essas mesmas bactérias produziram xilobiase, que é uma β -xilosidase não específica com poder de atuação nos oligossacarídeos, removendo unidades simples de xilose (26).

Estudos posteriores sobre a atividade de preparações enzimáticas de microrganismos existentes no rume evidenciaram 2 atividades enzimáticas distintas, compreendendo uma xilanase e uma xilobiase.

Foi verificado que só se obtinha uma xilobiase livre de xilana se quando os microrganismos eram desenvolvidos em um meio contendo apenas xilobiase (48).

Embora tenham sido várias as citações sobre a presença de xilanase em plantas, não foi encontrado nenhum processo de obtenção das mesmas.

Outra fonte de obtenção de xilanase já estudada diz respeito a possibilidades de extraí-la de preparações comerciais de celulase, principalmente oriundas de preparações de enzimas fúngicas, as quais são ricas em hemicelulases (28).

Os inibidores da xilanase pertencem aos inúmeros inibidores enzimáticos já bastante conhecidos. Entretanto, estudos mais específicos foram realizados sobre inibição provocada por Tris (48); mercúrio, prata e cádmio (27); cálcio e magnésio em níveis elevados (34) e cadeias laterais de arabinose (26).

Foi realizada purificação de xilanase por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em hidroxiapatita e filtração em gel (colunas de Sephadex G-25 e G-75). O produto obtido estava completamente desprovido de amilase, pectinase, arabinosidase e protease, detectando-se traços de celulase após prolongada incubação com celu

lose carboximetilada (28)..

Outra purificação de xilanase foi feita, tratando-se a solução de enzima crua (filtrado de cultura) proveniente de preparações fúngicas por sulfato de amônio a 20% de saturação. Agitou-se por 2 horas a 20°C. Após este período centrifugou-se e o sobrenadante foi reprecipitado com sulfato de amônio a 50% de saturação, deixando-se repousar por uma noite. Centrifugou-se e ambos os precipitados foram dissolvidos em 400 ml de água e dialisados por 2 dias com tampão de acetato pH 6,2. A solução de enzima dialisada foi posta em coluna de DEAE-celulose, eluindo-se a parte adsorvida na coluna com tampão de acetato M/20, M/10, M/5 e M/4, estabelecendo-se que a xilanase poderia ser eluída com tampão de acetato M/10. As frações que apresentaram atividades enzimáticas foram ajuntadas e fracionadas com sulfato de amônio 20 e 45% de saturação. O precipitado foi dissolvido em água, dialisado e novamente cromatografado em coluna de DEAE-celulose e concentrados com sulfato de amônio, e, novamente dialisados com tampão de acetato M/40 de pH 6,2. Esta solução de enzima apresentou-se 276 vezes mais purificada, tomando-se como base a atividade específica da xilanase (29).

Purificação de xilanase também tem sido feita por fracionamento com etanol a baixa temperatura (-20°C), seguida de centrifugação, diálise e exame por eletroforese. Foi determinada a atividade do produto obtido, identificando-se 2 tipos de enzima, classificadas como 3.2.1.8 e 3.2.1.37., já referidas anteriormente (35).

Pode-se ainda fazer uma purificação da xilanase, tratando-se a solução de enzima crua obtida por centrifugação do meio produtor por sulfato de amônio a 70% de saturação. O precipitado obtido foi coletado, dissolvido em água e dialisado sendo passado em colunas de celulose carboximetilada e de Sephadex G-75. Desta maneira a enzima foi purificada 20 vezes em relação à preparação crua (27).

Não há referências sobre a produção industrial de xilanase. Há dois tipos de xilanases à venda, que se limita às experiências de laboratório e são de custo elevadíssimo. Além de ser usada para o desdóbramento da xilana é mencionado seu uso em processos de clarificação de sucos de frutas (32).

Toma vulto, atualmente, o uso de certas enzimas como aditivos em

rações, objetivando melhor aproveitamento do alimento com o favorecimento da digestão. Em virtude de já existir no comércio um produto chamado Panase (mistura de celulase, protease e amilase), amplas possibilidades existem de se usar a xilanase com a mesma finalidade (41).

3. MATERIAL

3.1. - PARA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA XILANA

3.1.1. - Equipamentos

Moinho e peneira de 60 meshes, balança analítica, destilador, liquidificador, geladeira, bomba de vácuo, homogeneizador virtis, tecidos de 21 e 26 malhas por cm^2 para filtração, banho-maria, máquina de fazer gelo em flocos, balões fornecedores de nitrogênio e câmara receptora, agitadores magnéticos, cronômetros, peneiras, aparelhagens para cromatografia em placas e em papel, bicos de Bunsen, estufa, liofilizador, espectrofotômetro Zeiss.

3.1.2. - Reagentes

Benzeno, etanol, ácido acético glacial, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, clorofórmio, acetato de sódio, metanol, alfa-naftol, ácido sulfúrico, carbonato de bário, xilose, n-butanol, ácido dinitrosalicílico monoidratado, acetado de sódio, anilina, ácido ftálico, reagente de Benedict, todos p.a.; nitrogênio, hidróxido de potássio, ácido acético comerciais e papeis indicadores de pH.

3.1.3. - Vidraria

Beckers de diversos tamanhos, bandejas de pirex, cilindros graduados, balões, dessecador, funil de Büchner, gral, tubos de centrífuga, pipetas, buretas, tubos de ensaio, vidros para reativos, erlenmeyers, bastões de vidro, cápsulas de porcelana.

3.2. - PARA OBTENÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DA XILANASE

3.2.1. - Linhagens de fungos usadas

Para produção de xilanase, foram usadas as seguintes linhagens de fungos: Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp for

necido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Aspergillus sp (cor verde escura). Aspergillus sp (cor verde clara). As duas últimas culturas foram isoladas no laboratório a partir de casca de arroz moída e água, incubadas em estufa a 30°C durante 15 dias.

3.2.2. - Equipamentos

Estufa bacteriológica, suportes para tubos, geladeira, agitadores magnéticos, agitadores tipo "shaker", centrífuga capacidade 25.000 r.p.m., alças de platina completas, bico de Bunsen, banho-maria, espectrofotômetro Zeiss, potenciômetro, autoclave, bexigas de diálise, máquina de fazer gelo em flocos, liofilizador, aparelhagem para cromatografia em gel de poliacrilamida, cronômetro, balança analítica, espátulas, etc.

3.2.3. - Reagentes

Ácido tartárico, carbonato de cálcio, tartarato de sódio e potássio tetraidratado, hidróxido de sódio, ácido dinitrosalicílico monoidratado, fosfato de sódio, cloreto de sódio, ácido clorídrico, xilose, ácido acético, acetato de sódio, sulfato de amônio, carbonato de sódio, sulfato de cobre pentaidratado, citrato de sódio, temed, acrilamida, bis, tris, riboflavina, sacarose, glicina, tungstato de sódio, molibdato de sódio, ácido fosfórico, sulfato de lítio, bromo, metanol, etanol, acetona, todos p.a.; xilana de madeira de lariço nº X-3875 lote 62-C-2820 da firma Sigma U.S.A., bacto-ágar, caldo de batata (preparado no momento de usar), farelo de trigo de produção recente, extrato de levedura.

3.2.4. - Vidraria

Placas de petri, tubos de ensaio, beckers, cilindros graduados, erlenmeyers, pipetas, vidros para reagentes, balões volumétricos, tubos de centrífuga, bastões de vidro.

4. MÉTODOS

4.1. - PARA OBTENÇÃO DA XILANA (SUBSTRATO)

4.1.1. - Amostragem

A casca de arroz usada no presente trabalho nos foi fornecida por cerealista local, proveniente de vários tipos de arroz por ela beneficiados, havendo predominância dos tipos "Bico ganga" e "IC-12", cujos nomes científicos são respectivamente: "Oriza sativa variedade tipo ganga" e "Oriza sativa variedade IAC - 1246".

4.1.2. - Extração

O método usado foi o mesmo empregado para o sabugo de milho (2), com as seguintes modificações: a) a precipitação da xilana foi realizada com ácido acético glacial p.a., lentamente, com agitação, ao invés de ácido acético 50%; b) a centrifugação foi efetuada a 400 x g (2.000 r.p.m.) durante 4 horas à temperatura de 10°C, ao invés de 40.000 r.p.m. durante 20 minutos em centrifugação contínua.

4.1.3. - Identificação do produto (xilana) obtido

Fez-se a hidrólise, seguindo a metodologia adotada para as pentosanas (56); em seguida, foram feitos testes qualitativos para verificação de redutores com o reativo de Benedict e, identificação por cromatografia em placas de camada delgada (16), tendo xilose como padrão.

Outra hidrólise ácida das xilanas obtidas foi efetuada a frio, na qual usaram-se 0,4 g de amostra para as xilanas de arroz obtidas por extração direta e, por extração pelo processo usado para sabugo de milho. Para se verificar a efetividade da hidrólise a frio do polissacarídeo em estudo, usou-se a xilana da madeira de lariço nº X-3875 lote 62-C-2820 da firma Sigma U.S.A., como referência. Nesta hidrólise acrescentou-se à amostra 6 ml de H_2SO_4

na concentração de 14% deixando-se em repouso por 40 horas. Após este período a solução foi neutralizada com NaOH 50% até pH 8.

Filtrou-se, retirando uma alíquota de 0,5 ml para a dosagem de açúcares redutores pelo ácido dinitrosalicílico (47).

Para a hidrólise ácida a quente, usaram-se amostras das xilanas em estudo de 0,01 g acrescentando-se 5,0 ml de solução de ácido sulfúrico na concentração de 10%, levando-se os recipientes que continham a mistura ao banho-maria em água fervente, durante uma hora. Após este tempo retirou-se 2 ml do produto hidrolisado e neutralizou-se até pH 8,0 com solução a 50% de NaOH. Retirou-se 0,5 ml do hidrolisado neutralizado e dosou-se os açúcares redutores presentes pelo ácido dinitrosalicílico.

Fez-se também hidrólise enzimática, na qual usaram-se amostras das xilanas em estudo de 0,01 g acrescentando-se 3,5 ml da solução enzimática obtida por precipitação de 73 ml do extrato bruto produzido pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara) com sulfato de amônio a 80% de saturação dissolvido em 75 ml de água destilada e 2,0 ml de tampão de McIlvaine pH 7,8. Os recipientes que continham a mistura foram colocados em banho-maria a 55°C aí permanecendo por 14 horas até que se secasse todo o líquido existente. O resíduo obtido com a evaporação do solvente foi redissolvido em algumas gotas de água agitando-se com bastão e retirando-se uma gota para cromatografar em papel Whatman nº 1, no qual foi colocado xilose a 1% de concentração como padrão.

A mistura eluente usada foi n-butanol 40%; ácido acético 10%; água 50% (36) previamente saturado em câmara própria. O tempo gasto para a corrida do cromatograma foi de 15 horas. Em seguida o papel foi secado e as manchas detectadas com o seguinte revelador: anilina 0,93 g; ácido ftálico 1,66 g e butanol saturado de água q.s.p. 100 ml. Para o aparecimento das manchas, aqueceu-se a 80°C durante 25 minutos (40).

Em virtude da ausência de xilose em todos os cromatogramas, fez-se uma hidrólise ácida a quente a partir do hidrolisado enzimático, usando-se a metodologia anteriormente citada, modificando-se apenas o tempo de aquecimento em banho-maria que foi reduzido para 15 minutos e efetuando-se a dosagem de açúcares redutores pelo ácido dinitrosa-

cíclico. Os produtos resultantes da hidrólise ácida a quente, a partir do hidrolisado enzimático, quando cromatografados, revelaram a presença de xilose.

A cromatografia usada foi a de papel Whatman nº 1 anteriormente citada.

4.1.4.- Determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) total, solúvel em água e solúvel em HCl (1:9). Estas determinações foram feitas pelos processos adotados pelo Instituto Adolfo Lutz (44).

4.1.5. - Purificação parcial da xilana bruta

Foi feita por redissolução e reprecipitação, como já descrito (54), sendo o produto final dialisado com água destilada deionizada, para eliminar o excesso de ácido e, liofilizado. A efetividade da diálise foi testada no potenciômetro, tendo água destilada como padrão.

4.1.6. - Extração da xilana diretamente da casca integral.

Partiu-se de 100 g da casca de arroz integral que foram agitadas durante 45 horas com 2 litros de solução de NaOH comercial a concentração de 15%. Após este período, filtrou-se a vácuo em papel de 21 malhas por cm², precipitando-se a xilana com ácido acético comercial na presença de gelo.

Após centrifugação com uma força centrífuga de 400x g por horas a 10°C o produto obtido foi lavado com água até eliminação completa do ácido, liofilizado e pesado.

2. - PARA OBTENÇÃO DA XILANASE (ENZIMA)

4.2.1. - Obtenção dos fungos usados para a produção de xilanase

Além do Geotrichum sp já mencionado em material (3.2.1), outros fungos foram obtidos por fermentação de 100 g de casca de ar-

roz moída a 60 meshes com 200 ml de água destilada durante 15 dias à temperatura de 30°C. Após esta incubação observou-se a formação de uma massa esponjosa superficial de cor verde escura.

Este material foi tocado com alça de platina e repicado para vários tubos contendo meio de xilana esterilizado a 121°C durante 15 minutos. A composição deste meio era:

xilana	10 g
bacto ágar	15 g
caldo de batata....	200 ml

O caldo de batata foi obtido fervendo 1 kg de batata descascada e lavada em 1 litro de água destilada, desprezando-se os pedaços.

Assim se isolaram dois fungos do gênero Aspergillus por meio de repicagens sucessivas. As culturas, após crescimento durante 5 dias na estufa a 30°C, eram guardadas na geladeira para repiques mensais.

De acordo com a classificação feita pelo Instituto Biológico de São Paulo, os fungos obtidos (uma colônia verde clara e outra verde escura) pertencem ao gênero Aspergillus, não tendo sido possível a identificação da espécie.

4.2.2. - Manutenção da cultura fúngica

As três culturas fúngicas usadas nas experiências foram mantidas por repiques mensais realizados em condições de assepsia.

O crescimento se efetuava por incubação na estufa, por 5 dias, à temperatura de 30°C, sendo que após este período eram levadas à geladeira para conservação.

4.2.3. - Produção da xilanase propriamente dita

A xilanase foi produzida por inoculação de placas contendo culturas fúngicas num meio líquido previamente distribuído em balões e autoclavados a 121°C durante 15 minutos. O meio líquido de crescimento tinha a seguinte composição:

farelo de trigo.....	70 g
extrato de levedura.....	1 g
carbonato de cálcio.....	10 g
água q.s.p.	1 litro

Posteriormente, este meio foi substituído pelo seguinte:

casca de arroz moída a 60 mesh.....	40 g
farelo de arroz.....	60 g
extrato de levedura.....	3,7g
carbonato de cálcio.....	10 g
água q.s.p.....	1 litro

A distribuição do meio foi feita em balões com capacidade cinco vezes superior ao volume usado. A inoculação se fez evitando contaminação e, logo após, os balões foram colocados em agitadores tipo "shaker" para o crescimento dos fungos, à temperatura de 30°C.

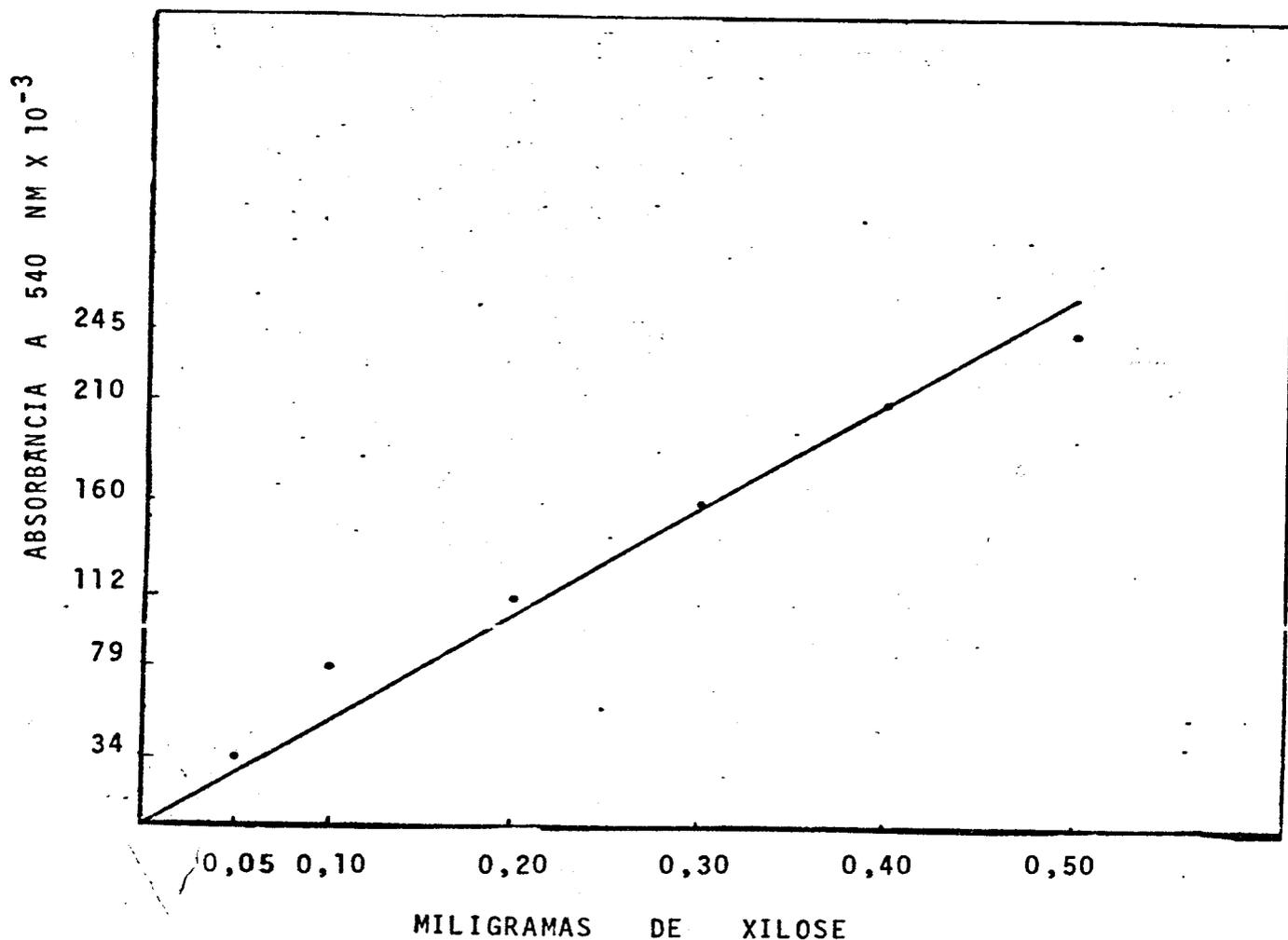
Também foram realizadas experiências, para verificar a influência da homogeneidade da agitação e da temperatura ambiente na produção da enzima. Cinco dias após a inoculação, iniciaram-se as medidas de atividade da xilanase.

4.2.4. - Medida da atividade enzimática

Para esta determinação usou-se o método já descrito (33), reduzindo-se o volume citado a sua metade e, como tampão, usou-se ácido acético e acetato de sódio pH 5,0.

A medida da quantidade de xilose formada foi feita usando-se como reagente ácido dinitrosalicílico, conforme metodologia já descrita (47), e a curva padrão da figura 1.

FIGURA 1 : Curva padrão de xilose



Usou-se o sobrenadante obtido por centrifugação da cultura líquida como solução enzimática, sendo que foram determinadas as absorvâncias da mistura de reação a 540 nm com zero minuto de incubação e, após 15 minutos. Procedeu-se assim devido à presença de substâncias redutoras no meio. A diferença existente entre estas duas leituras foi levada à curva padrão de xilose, para cálculo da quantidade de açúcares redutores produzidos enzimaticamente, expressos em xilose.

O cálculo da atividade enzimática foi feito em relação a quantidade de miligramas de "xilose" produzidas por 1 ml do sobrenadante da cultura fúngica em contacto com o substrato a 50°C, durante 15 minutos e em pH 5,0.

As quantidades usadas na mistura de reação foram:

0,5 ml do sobrenadante da cultura fúngica - Enzima

1,25 ml da solução de xilana a 1% de concentração - Substrato

1,25 ml de tampão de ácido acético-acetato de sódio pH 5,0, compreendendo um volume total de 3 ml para a incubação.

Antes de se colocar a enzima, o tubo contendo o substrato e o tampão foi colocado em banho-maria a 50°C, por 3 minutos, a fim de se equilibrar àquela temperatura. Imediatamente, após a colocação da enzima foram retirados 0,5 ml da preparação e colocados em um tubo que já continha 2,0 ml de ácido dinitrosalicílico, misturando-se bem para inativar as enzimas. O resto da mistura foi deixado em incubação no banho-maria a 50°C durante 15 minutos.

Decorrido o tempo, retirou-se outra amostra de 0,5 ml colocando-se em outro tubo contendo ácido dinitrosalicílico. As determinações foram feitas em duplicata.

A diferença entre estas duas leituras levadas à curva padrão forneceram uma quantidade de "xilose" correspondente à duodécima parte da fornecida por 1 ml da mesma preparação enzimática. Assim, multiplicando-se por 12 o resultado anteriormente obtido, ter-se-á o valor correspondente à quantidade de miligramas de glicídeos redutores (xilose) fornecidos por mililitro do filtrado, nas condições acima citadas. Essa proporção foi usada para o cálculo da atividade enzimática.

4.2.5. - Definição da unidade de atividade enzimática

A unidade de atividade de xilanase foi definida como, a quantidade de enzima capaz de produzir 1 mg de glicídeos redutores ("xilose") nas condições do método (15 minutos, pH ótimo, temperatura de 50°C e usando-se 1,25 ml de xilana na concentração de 1%).

4.2.6. - Extração da enzima e sua purificação.

Em todas as operações referentes ao estudo do comportamento enzimático, foram usadas condições favoráveis (refrigeração e rapidez no manuseio), a fim de serem evitadas as perdas de atividade.

Toda a água utilizada nos testes tinha sido deionizada recentemente e refrigerada.

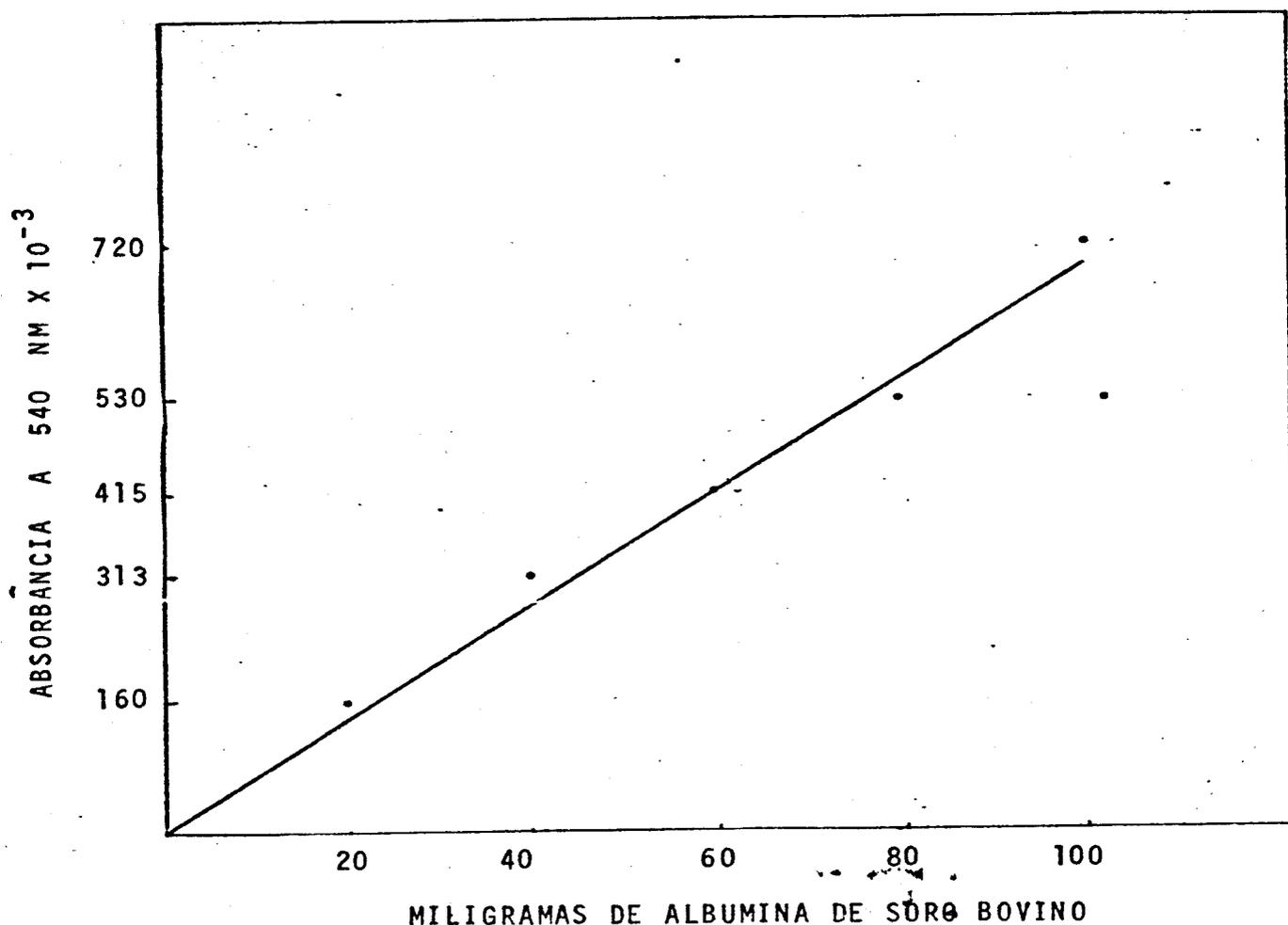
As preparações de maior atividade enzimática encontradas foram centrifugadas a uma força centrífuga de 2.000xg, durante 20 minutos seguida de fracionamento com sulfato de amônio a 40%, 60% e 80% de saturação, respectivamente, conforme a tabela de saturação (7).

Em seguida centrifugou-se a uma força centrífuga de 1.500xg, à temperatura de -4°C , e os precipitados foram transferidos com a menor quantidade de água possível para bexigas de diálise, usando-se água deionizada gelada. A efetividade da diálise, foi comprovada pelo uso de 2 ml do reativo de Nessler para 1 ml de água destilada nas mesmas proporções. A diálise foi considerada completa (ausência de sulfato de amônio), quando a coloração obtida nos testes deram características visuais iguais às do teste em branco. Após a diálise, as enzimas foram distribuídas em vidros pequenos (1 ml da solução enzimática para cada vidro), liofilizadas e guardadas no congelador até o uso.

4.2.7. - Determinação da atividade específica da xilanase

Para esta determinação é necessário, além da medida da atividade enzimática descrita anteriormente, a dosagem da quantidade de proteínas, que foi feita pelo método de Lowry et al (37), tendo como padrão albumina de soro bovino cuja curva é vista na figura 2.

FIGURA 2 : Curva padrão para o cálculo de proteínas.



4.2.8. - Comportamento eletroforético da xilanase

Este estudo foi feito com a enzima liofilizada dissolvida em 0,5 ml de água destilada no momento da aplicação sobre o gel de poliacrilamida previamente preparado, seguindo-se a técnica já descrita (24).

Após a migração das partículas, foi feita a revelação com negro de Schwartz a 0,1 g%, observando-se seu comportamento. Esta operação foi repetida 5 vezes para confirmação dos resultados, utili-

zando-se as diferentes frações da enzima fornecidas pelo tratamento com sulfato de amônio.

4.2.9. - Estudo das propriedades da reação enzimática

A enzima usada para este estudo foi a produzida pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara) e precipitada do filtrado do meio de cultura por sulfato de amônio a 80% de saturação, seguido de diálise.

Foram estudadas : a influência do pH, da concentração do substrato, da concentração da enzima, efeito da temperatura e do tempo de incubação, na atividade da xilanase. Os resultados foram expressos em forma de curvas (figuras 3 a 7), que aparecem em resultados, juntamente com a descrição das condições em que os dados foram obtidos.

5. RESULTADOS

5.1. - EXTRAÇÃO DA XILANA BRUTA.

Para este estudo, usaram-se 100 g de casca de arroz moída a 60 meshes para cada amostra, seguindo-se a metodologia já citada. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 1.

QUADRO 1 : Porcentagens de holocelulose e de xilana bruta obtidas.

Amostra Nº	Peso após		Peso	
	extração com água (g%)	extração benzeno- -etanol (g%)	holocelulose (g%)	xilana bruta (g%)
1	90,0	89,0	86,1	7,1 (x)
2	92,4	90,4	85,5	7,2 (xx)
3	91,2	86,8	84,7	7,0 (xxx)
4	90,3	86,7	86,0	7,3 (xxx)
5	88,3	85,7	85,0	7,3 (xxx)
6	89,5	84,2	82,0	6,9 (xxx)
7	93,0	91,6	90,2	8,7 (xxx)
8	93,0	92,0	91,8	7,9 (xxx)
9	93,1	92,2	90,0	7,2 (xxx)
10	93,4	92,5	90,5	7,7 (xxx)
MÉDIA	91,4	89,1	87,1	7,4

(x) - Cor negra, aspecto cristalino, seca em estufa a 38°C.

(xx) - Cor negra, aspecto cristalino, seca em dessecador à temperatura ambiente

(xxx) - Cor marrom, aspecto amorfo, seca em liofilizador.

5.2. - DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO DA XILANA BRUTA (CINZAS) E DA ALCALINIDADE DAS CINZAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM ÁGUA.

Para esta determinação usou-se como amostra a mistura das xilanas brutas provenientes do quadro 1, após trituração e peneiragem em peneiras de 25 crivos por cm^2 . Os resultados expressos no quadro 2 representam a média de 3 determinações.

QUADRO 2 : Porcentagens de cinzas totais, solúveis e insolúveis e das alcalinidades existentes na xilana bruta do quadro 1.

Peso da amostra, em gramas (g)	5,0000
Cinzas totais g%	0,7660
Cinzas solúveis em água g%	0,0205
Alcalinidade, em mililitros de sol. 1N/100 g das cinzas solúveis em água	0,6295
Alcalinidade, em mililitros de sol. 1N/100 g das cinzas insolúveis em água	0,9115
Cinzas solúveis em HCl (1:9) g%	0,0633

5.3.- PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XILANA BRUTA EXTRAÍDA DA CASCA DE ARROZ.

Nesta determinação usaram-se 10 g da xilana bruta para cada ensaio, fazendo-se 2 ensaios. A xilana bruta foi obtida misturando-se as amostras do quadro 1, após trituração e peneiragem, em peneiras

de 25 crivos por cm^2 .

No primeiro ensaio obteve-se 6,4 g% de xilana semi-purificada e no segundo ensaio 6,8 g%, perfazendo uma média de 6,6 g%, em relação à casca de arroz.

Após purificação parcial, a xilana obtida apresentou-se na forma de pó, com cor amarelo-clara.

5.4. - EXTRAÇÃO DA XILANA BRUTA POR PROCESSO MAIS ECONÔMICO (DIRETO).

Nesta obtenção foram usados reagentes comerciais em todo o experimento. A extração foi feita com hidróxido de sódio na concentração de 15% num volume de 2 litros em agitação constante por 45 horas usando-se a casca de arroz integral. A amostra usada foi de 100 g, obtendo-se 20% de xilana bruta que apresentou-se com aspecto de grumos compactos com cor branca pérola.

5.5. - DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS) DA XILANA BRUTA OBTIDA EM 5.4., E DA ALCALINIDADE DAS CINZAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS EM ÁGUA.

A amostra usada nesta determinação constituiu-se de xilana bruta extraída pelo processo direto, submetida a trituração e peneiragem em peneiras de 25 crivos por cm^2 . Os resultados representam a média de 2 determinações e são citados no quadro 3.

QUADRO 3 . Porcentagens de cinzas totais, solúveis e insolúveis e das alcalinidades existentes na xilana bruta extraída pelo processo direto

Peso da amostra em gramas (g)	5,0000
Cinzas totais em g%	7,0640
Cinzas solúveis em água g%	2,9902
Alcalinidade, em mililitros de sol. 1N/100 g das cinzas solúveis em água.	79,0991
Alcalinidade, em mililitros de sol. 1N/100 g das cinzas insolúveis em água	1,4754
Cinzas solúveis em HCl (1:9)	4,8751

5.6. - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES, EXPRESSOS EM XILOSE, PRODUZIDOS POR HIDRÓLISE DA XILANA.

Para esta determinação usaram-se as xilanas extraídas da casca de arroz citadas no quadro 1, e, a extraída pelo processo mais econômico mencionado no item 5.4., tendo como referência para comparação a xilana de madeira de lariço nº X-3875 lote 62-C-2820 da firma Sigma, U.S.A.

Foram efetuadas hidrólises ácidas a frio, a quente e hidrólise enzimática seguida de hidrólise ácida a quente em condições suaves, conforme metodologia descrita anteriormente. Os produtos resultantes das hidrólises acima mencionadas foram cromatografados, revelando a presença de xilose nas 3 xilanas estudadas. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 4 e representam a média de 2 determinações.

QUADRO 4 : Porcentagens de glicídeos redutores expressos em xilose fornecidos pelas xilanas de arroz e de madeira de lariço.

Xilana	Glicídeos redutores fornecidos pela hidrólise		
	ácida a frio g% (X)	ácida a quente g% (XX)	ácida a quente precedida da hidrólise enzimática. g% (XX)
da madeira de lariço	0,80	83,54	84,48
da casca de arroz (quadro 1)	7,54	86,16	117,25
da casca de arroz (extração direta)	4,30	94,34	78,46

(X) - Amostra usada de 0,4 g

(XX) - Amostra usada de 0,01 g

5.7. - PRODUÇÃO DE XILANASE PELO FUNGO GEOTRICHUM SP

A atividade da enzima foi medida pela produção de miligramas de glicídeos redutores (expressos em xilose), a partir da xilana da madeira na concentração de 1 g%, tampão de ácido acético/acetato de sódio 0,2 M e pH 5,0 e extrato bruto de Geotrichum sp incubados em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Reação interrompida com ácido dinitrosalicílico. Calculou-se a concentração em miligramas de glicídeos redutores pela absorbância em 540 nm, correspondentes a 1 ml do extrato fúngico bruto. Os resultados estão apresentados no quadro 5.

QUADRO 5 : Atividade da xilanase em extrato de Geotrichum sp, cultivado em diferentes condições.

Dias de incubação	Cultura mantida a 30°C com agitação regular .	Cultura mantida a 30°C com agitação irregular	Cultura mantida a temperatura ambiente e agitação regular
10	2,070	0,444	0,696
14	1,980	0,816	0,420
15	2,340	1,104	2,040
16	4,044	(x)	5,904
17	2,784	2,544	1,800
18	2,772	2,544	0,324
20	4,104	6,000	5,604
21	3,864	0,372	4,272
22	2,712	2,616	5,604
23	1,104	0,780	0,780
27	5,364	3,960	4,044
28	2,244	1,740	4,920
30	3,000	3,360	6,624

(x) - Acidente, com perda do resultado

5.8. - PURIFICAÇÃO DA XILANASE PRODUZIDA PELA CULTURA DE GEOTRICHUM SP.

A purificação parcial do extrato bruto de Geotrichum sp foi feita pela precipitação com sulfato de amônio a 40%, 60% e 80% de saturação, respectivamente, seguidas de diálise. O extrato enzimático bruto usa do correspondeu à mistura dos extratos obtidos por culturas mantidas a 30°C com agitação regular e irregular e, à temperatura ambiente com agitação regular. Os resultados obtidos no estudo das frações isoladas encontram-se no quadro 6.

QUADRO 6 : Purificação parcial da xilanase produzida pelo Geotrichum sp

Fração	Vol. ml	Atividade (u/ml)	atividade total	% atividade total recuperada	Proteínas mg/ml	Atividade específica.
Extrato bruto	150	4,464	669,6	100,00	0,188	23,74
Pp (NH ₄) ₂ SO ₄ a 40% de sat.	100	2,736	273,6	40,86	0,077	35,53
Pp (NH ₄) ₂ SO ₄ a 60% de sat.	100	0,194	19,4	2,89	0,048	4,04
Pp (NH ₄) ₂ SO ₄ a 80% de sat.	100	0,104	10,4	1,55	0,035	2,97

A enzima isolada com sulfato de amônio a 40% de saturação apresentou uma precipitação após a diálise, cujo precipitado foi separado por centrifugação a uma força centrífuga de 1.500 x g e -5°C durante 15 minutos.

O precipitado obtido foi diluído para 10 ml e embora apresentasse um teor de proteínas de 0,010 mg/ml não apresentava atividade enzimática.

O sobrenadante tinha um volume de 100 ml; atividade enzimática de 0,864 u/ml ; teor de proteínas de 0,067 mg/ml e atividade específica de 12,89.

5.9. - PRODUÇÃO DE XILANASE PELOS FUNGOS GEOTRICHUM SP., ASPERGILLUS SP (COR VERDE ESCURA) E ASPERGILLUS SP (COR VERDE CLARA).

As atividades das xilanases fornecidas pelas 3 diferentes culturas fúngicas foram medidas pelas determinações dos miligramas de glicídeos redutores (expressos em xilose) produzidos a partir da xilana da madeira na concentração de 1 g%, tampão de ácido acético/ acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 e extrato bruto do Geotrichum sp., do Aspergillus sp (cor verde escura) e do Aspergillus sp (cor verde clara) incubados em banho-maria a 50°C por 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido dinitrossalicílico e as quantidades de glicídeos redutores em miligramas, foram determinadas pelas medidas das absorbâncias em 540 nm, correspondentes a 1 ml dos extratos fúngicos brutos respectivos. Os resultados obtidos poderão ser analisados pelo exame do quadro 7.

QUADRO 7: Ensaio de xilanase em extrato de Geotrichum sp., de Aspergillus sp (cor verde escura) e de Aspergillus sp (cor verde clara).

Dias de incubação	Atividade Enzimática		
	Culturas mantidas à temperatura ambiente com agitação regular		
	<u>Geotrichum sp</u>	<u>Aspergillus sp</u> (cor verde escura)	<u>Aspergillus sp</u> (cor verde clara)
5	1,296	0(zero)	3,696
6	0,912	1,680	3,972
7	2,832	2,028	3,648
8	0,336	2,280	4,512
9	1,728	1,344	5,388
10	2,100	1,596	4,860
12	0,912	0,288	5,016
13	1,272	2,616	5,568
14	1,224	1,200	4,932
15	1,188	1,224	6,804
17	1,368	1,980	5,136
19	2,100	2,760	7,080
21	3,288	1,824	4,980
22	2,412	2,328	5,748
23	2,868	2,160	4,860
24	2,352	1,296	3,996
27	2,388	1,704	8,220
28	3,120	2,436	5,040

5.10. - FRACIONAMENTO DA XILANASE PRODUZIDA PELA CULTURA DE ASPERGILLUS SP (COR VERDE CLARA).

Esta cultura fúngica foi tomada como fonte de enzima para o res

tante deste trabalho, por apresentar características de produção bem superiores às outras duas estudadas (quadro 7).

O fracionamento foi feito pelo tratamento do extrato bruto com sulfato de amônio. As medidas das atividades enzimáticas, dosagem de proteínas e atividades específicas das preparações fúngicas foram efetuadas antes e após o fracionamento das enzimas por sulfato de amônio a 40%, 60% e 80% de saturação, respectivamente, seguidas de diálise. Os resultados obtidos encontram-se no quadro 8.

QUADRO 8 : Purificação parcial da xilanase do Aspergillus sp (cor verde clara)

Fração	Vol. ml	Atividade (u/ml)	Atividade total	% atividade total recuperada	Proteínas mg/ml	Atividade específica
Extrato bruto	130	5,040	655,2	100,00	0,384	13,12
Pp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 40% de sat.	50	2,388	119,4	18,22	0,163	14,65
Pp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60% de sat.	35	2,580	90,3	13,76	0,101	25,54
Pp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de sat.	25	1,566	39,1	5,96	0,082	19,09

A enzima precipitada por sulfato de amônio a 40% de saturação apresentou uma precipitação após a diálise, que foi separada por centrifugação a uma força centrífuga de 10.000x g e -5°C durante 15 minutos.

O precipitado obtido foi diluído para 10 ml apresentando uma atividade de 0,912 u/ml; teor de proteínas de 0,131 mg/ml e atividade específica de 6,96.

O sobrenadante tinha um volume de 50 ml; atividade enzimática de 1,530 u/ml; teor de proteínas de 0,122 mg/ml e atividade específica de 12,54.

5.11. - ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DIRETA DA XILANASE PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS SP (COR VERDE CLARA) COM SULFATO DE AMÔNIO A 80% DE SATURAÇÃO.

Como o fracionamento do extrato enzimático desse fungo não resultou em nenhuma purificação sensível de uma fração em relação a outra, resolveu-se trabalhar com o precipitado total. Para a obtenção do precipitado partiu-se de 132 ml do extrato bruto. As medidas das atividades enzimáticas, porcentagem da atividade total recuperada, dosagem de proteínas e atividade específica das preparações fúngicas, foram efetuadas antes e após o fracionamento das enzimas pela precipitação direta com sulfato de amônio a 80% de saturação, seguida de diálise. Os resultados obtidos estão expressos no quadro 9.

QUADRO 9: Purificação parcial da xilanase do Aspergillus sp (cor verde clara) proveniente da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação.

Determinações	Material analisado	
	Extrato bruto	Pp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação.
Volume (ml)	132	75
Atividade (u/ml)	5,16	3,83
Atividade total (unidades)	681,12	287,10
Porcentagem de atividade total	100,00	42,15
Proteínas (mg/ml)	0,058	0,041
Atividade específica	88,96	93,36

5.12. - ESTUDO DA EFETIVIDADE DE DIVERSOS AGENTES PRECIPITANTES PARA O ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS XILANASES DO ASPERGILLUS SP (COR VERDE CLARA).

Verificado que, nem o fracionamento, nem a precipitação direta (80% de saturação) com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conduzia a um grau de purificação a precíavel e que, a atividade recuperada no precipitado estava em tor no de 50% apenas, tentou-se o uso de vários outros precipitantes, com o objetivo de aumentar o grau de purificação e o rendimento. Os resultados obtidos quando foram usados etanol, metanol e acetona, em diferentes proporções como precipitantes, comparados com o sulfato de amônio a 80% de saturação, podem ser apreciados pelo exame do qua dro 10.

Verificou-se que, apenas o precipitado de etanol (1:1 v/v) e do metanol (2:1 v/v) apresentou grau de pureza um pouco superior ao do sulfato de amônio a 80% de saturação, os demais foram inferiores. Apesar disto a porcentagem da atividade total recuperada no precipitado, foi bem superior quando se empregou o sulfato de amônio. Por estes motivos adotou-se o precipitado com sulfato de amônio a 80% de saturação, como fonte de enzima, para os estudos que se seguem.

É interessante lembrar que a atividade enzimática não precipitada com os diferentes precipitantes usados, permaneceu quase que to da ela, no sobrenadante, havendo pouca inativação da enzima pela a- ção dos precipitantes.

QUADRO 10 - Purificação parcial da xilanasase do Aspergillus sp (cor verde clara) usando diferentes agentes precipitantes

Fração	Vol. ml	Atividade u/ml	Atividade total	Atividade total recuperada	Proteínas mg/ml	Atividade específica	Grau de purificação (n.º vezes)
Filtrado enzimático	70	1,98	138,60	100,00	0,229	8,64	0,00
Pp(NH ₄) ₂ SO ₄ 80% satur.	50	1,55	77,50	55,92	0,082	18,90	2,18
Etanol 1:1 v/v	36	0,74	26,64	19,22	0,014	52,86	6,11
Metanol 1:1 v/v	30	0,23	6,90	4,98	0,012	19,16	2,21
Acetona 1:1 v/v	30	0,29	8,70	6,28	0,026	11,15	1,29
Etanol 2:1 v/v	50	0,26	13,00	9,38	0,021	12,38	1,43
Metanol 2:1 v/v	37	1,19	44,03	31,77	0,029	41,03	4,75
Acetona 2:1 v/v	40	0,29	11,60	8,37	0,016	18,12	2,09

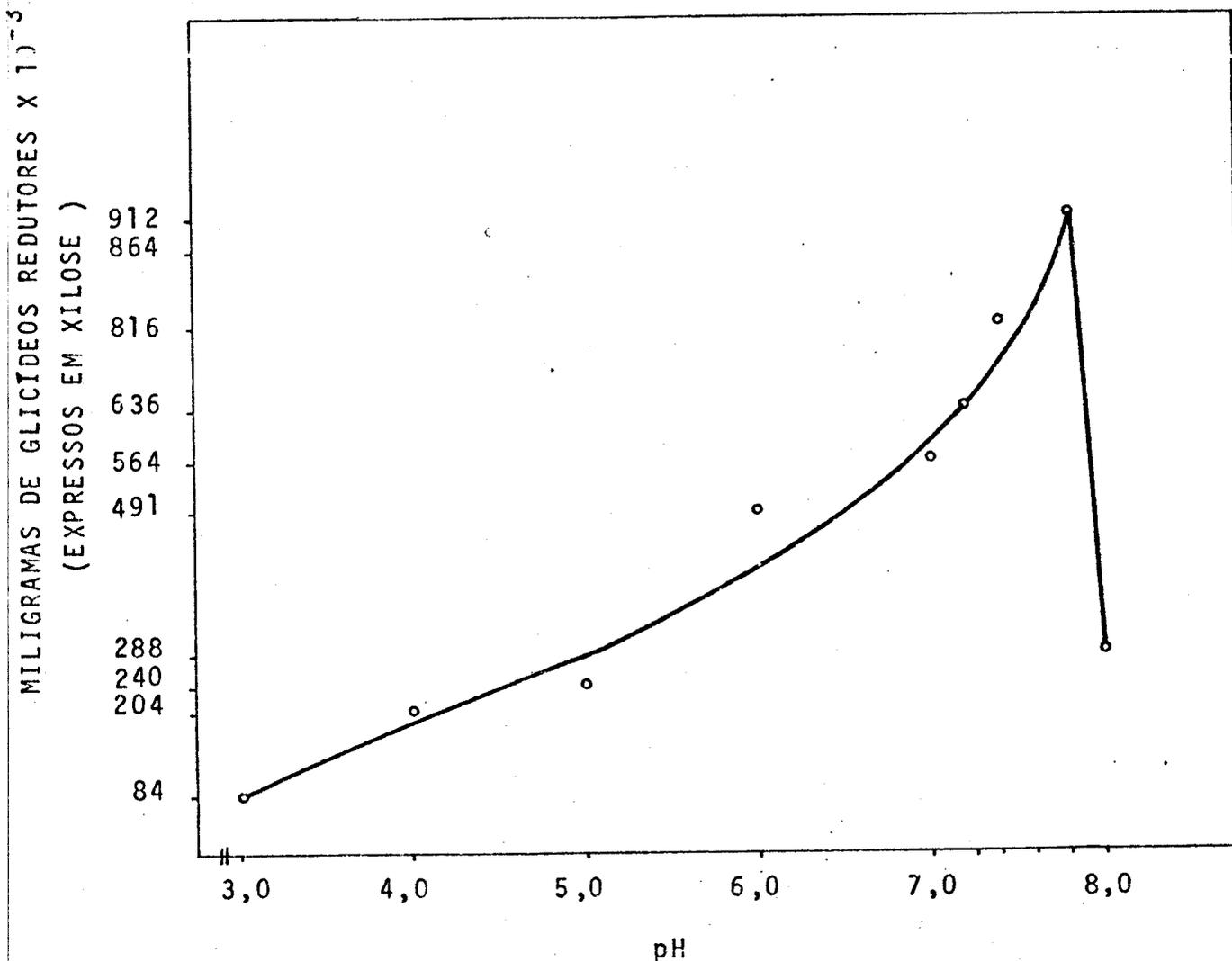
5.13. - RESULTADOS DO ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DA XILANASE

5.13.1. - Influência do pH

A influência do pH na atividade da fração precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação, usando xilana semi-purificada da casca de arroz como substrato e tampões McIlvaine na faixa de pH entre 3,0 e 8,0, está representada na figura 3. A enzima apresentou um máximo de atividade no pH 7,8.

FIGURA 3: Influência do pH na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A atividade foi medida no precipitado obtido de 132 ml de filtrado enzimático, que foi dialisado e o volume completado a 75ml. A mistura de reação continha: 0,5 ml da solução enzimática, 1,25 ml de tampão McIlvaine e pH de 3,0 - 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 7,2 - 7,4 - 7,6 - 7,8 e 8,0, 1,25 ml da suspensão de xilana a 1%. Após incubação por 15 minutos a 50°C, a reação foi interrompida com ácido dinítrosalicílico (2,0 ml) para a determinação de glicídeos redutores (expressos em miligramas de xilose).

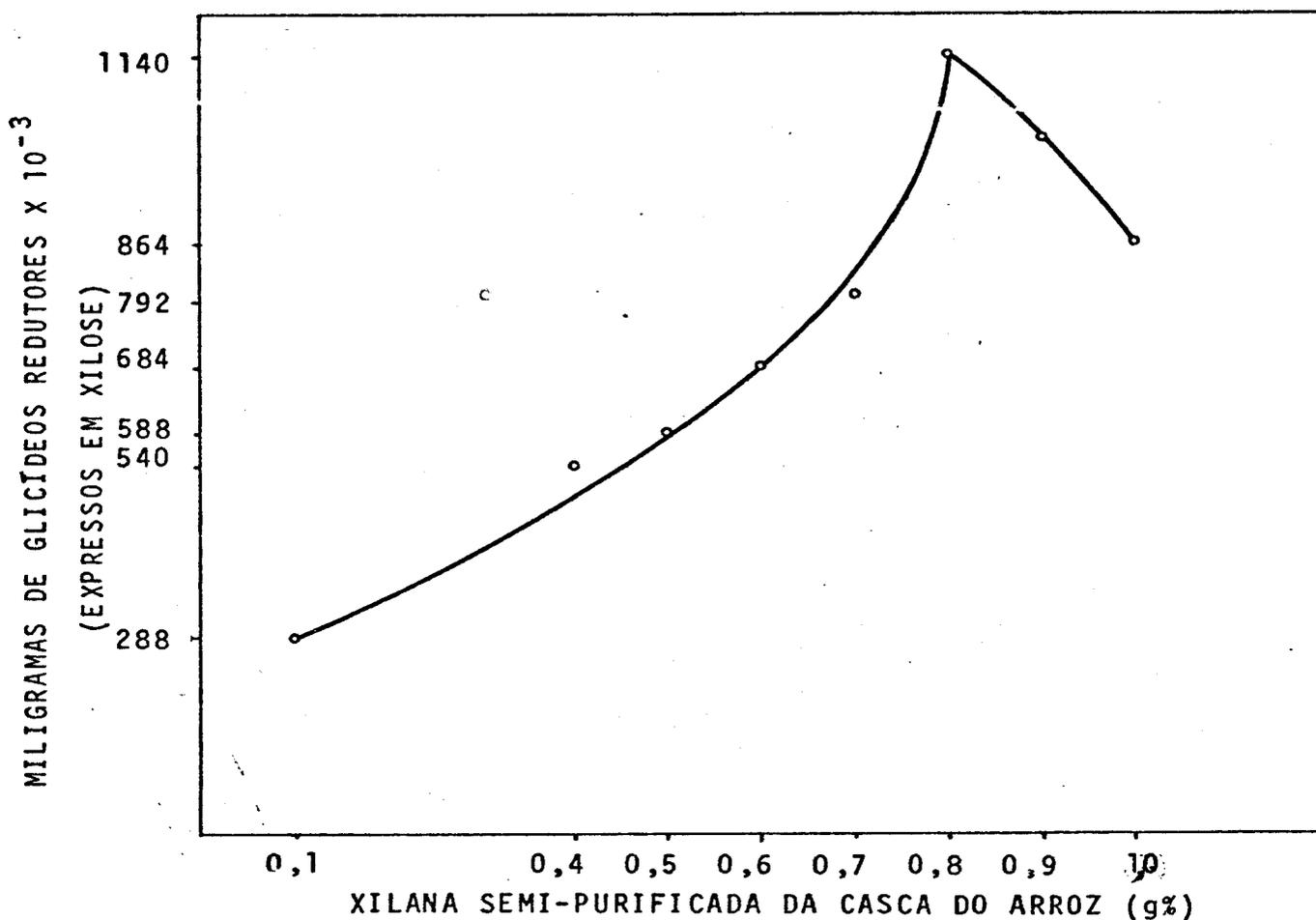


5.13.2. - Influência da concentração do substrato.

A atividade da fração precipitada com $(NH_4)_2SO_4$ a 80% de saturação sobre várias concentrações de xilana semi-purificada extraída da casca de arroz está representada na figura 4. O máximo de atividade correspondeu à concentração de 0,8 g%

FIGURA 4: Influência da concentração do substrato na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A atividade foi medida no precipitado obtido de 132 ml de filtrado enzimático, que foi dialisado e o volume completado a 75ml. A mistura de reação continha : 0,5 ml da solução enzimática, 1,25 ml de tampão McIlvaine pH 7,8 e 1,25 ml da suspensão de xilana nas concentrações de 0,1 - 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 e 1,0 g%. Após incubação por 15 minutos a 50°C, a reação foi interrompida com ácido dinitrosalicílico (2,0 ml) para a determinação de glicídeos redutores (expressos em miligramas de xilose).

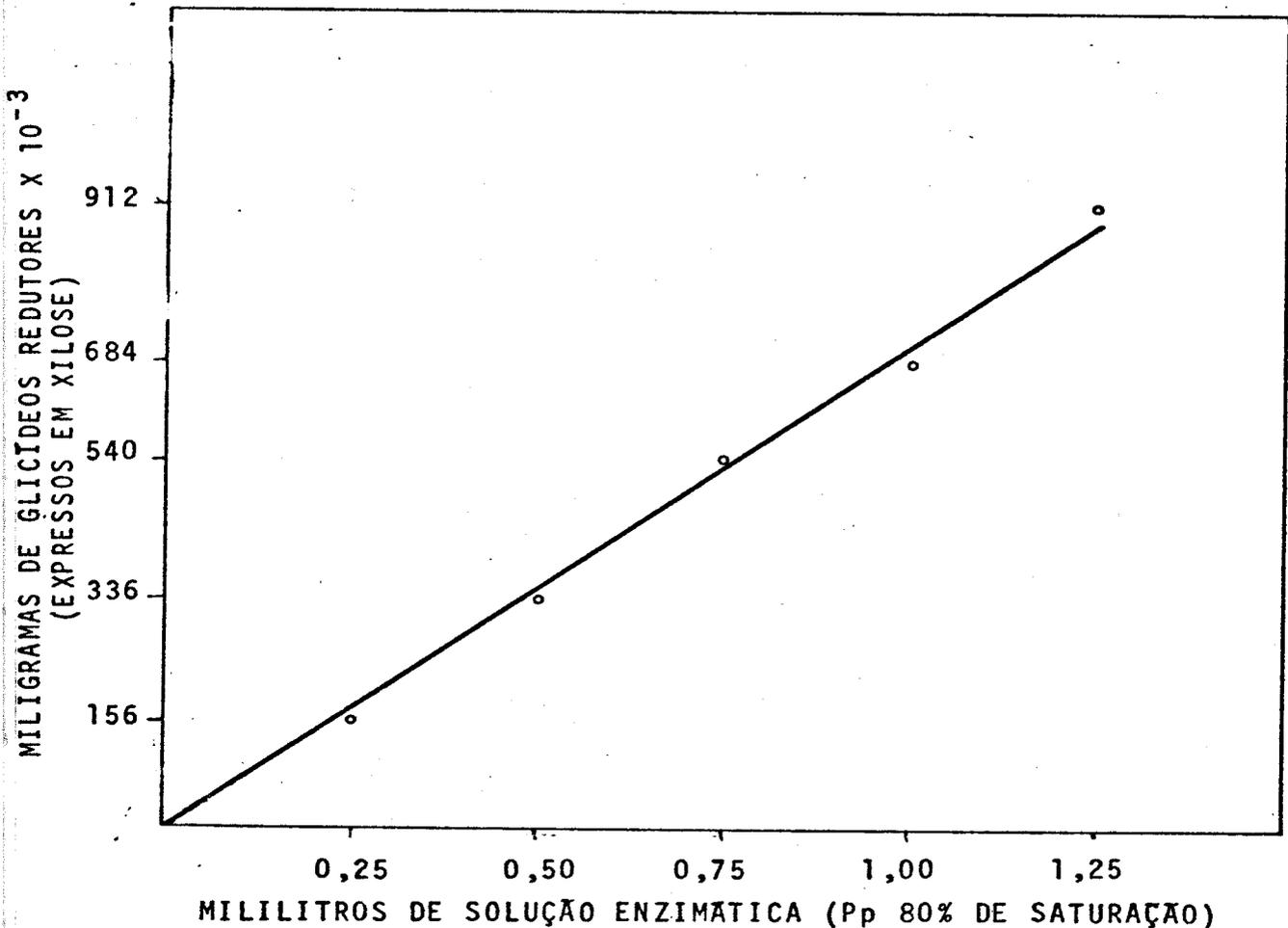


5.13.3. - Influência da concentração da fração enzimática precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

Os resultados obtidos foram registrados em gráfico na figura 5, entre 0,25 e 1,25 ml da solução enzimática na presença de 1,25 ml da suspensão de xilana semi-purificada extraída da casca de arroz e tampão McIlvaine pH 7,8 q.s.p. 3,0 ml. Observou-se proporcionalidade entre concentração da enzima e velocidade da reação.

FIGURA 5 : Influência da concentração da fração enzimática precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A atividade foi medida no precipitado obtido de 132 ml de filtrado enzimático, que foi dialisado e o volume completado a 75 ml. A mistura de reação continha: 1,25 ml da suspensão de xilana a 1%, 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1,00 e 1,25 ml da solução enzimática e tampão McIlvaine pH 7,8 q.s.p. 3,0 ml. Após incubação por 15 minutos a 50°C, a reação foi interrompida com ácido dinitrosalicílico (2,0 ml) para a determinação de glicídeos redutores (expressos em miligramas de xilose).



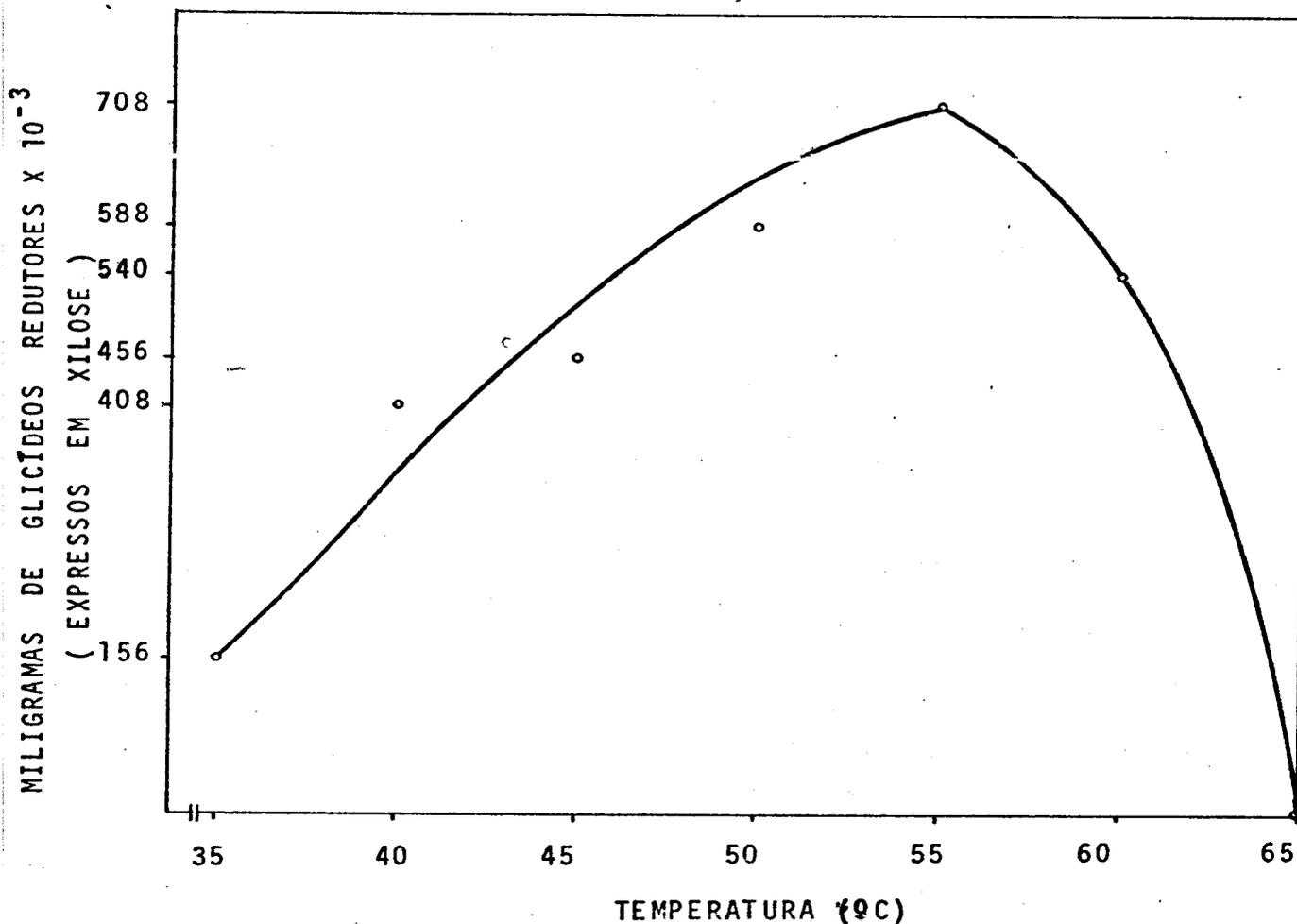
5.13.4. - Influência da temperatura.

A influência da temperatura na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação é mostrada na figura 6.

O máximo de atividade situou-se entre 50 e 55°C, sendo nula a 65°C.

FIGURA 6: Influência da temperatura na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

A atividade foi medida no precipitado obtido de 152 ml de filtrado enzimático, que foi dialisado e o volume completado a 75 ml. A mistura de reação continha: 0,5 ml da solução enzimática, 1,25 ml de tampão McIlvaine no pH 7,8 e 1,25 ml de suspensão de xilana a 1%. Após incubação por 15 minutos nas temperaturas de 35 - 40 - 45 - 50 - 55 - 60 e 65°C, a reação foi interrompida com ácido dinitrosalicílico (2,0 ml) para a determinação de glicídeos redutores (expressos em miligramas de xilose).

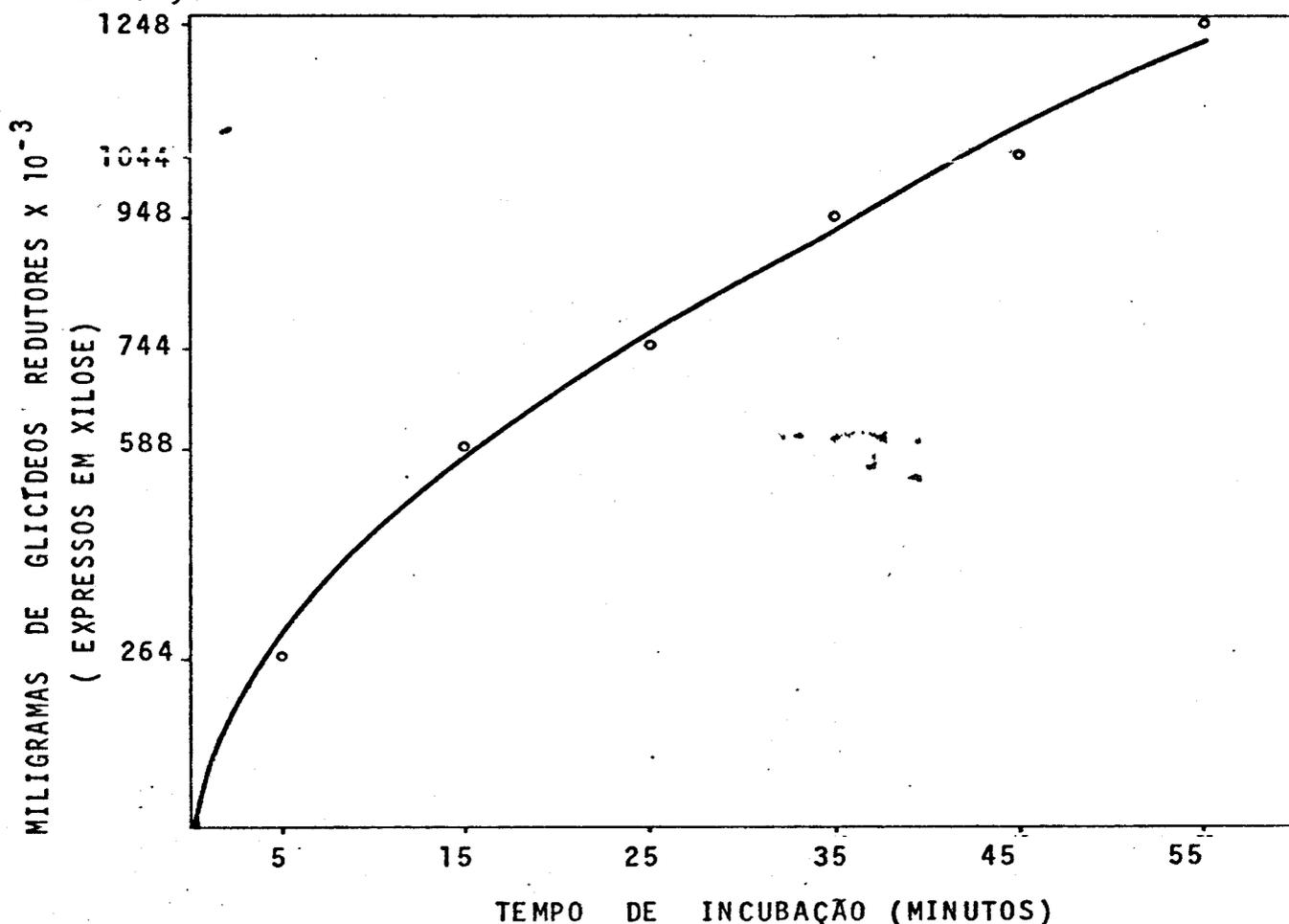


5.13.5. - Influência do tempo de incubação.

Foi registrada no gráfico da figura 7 a curva obtida na faixa de 5 a 55 minutos de incubação. Verificou-se falta de proporcionalidade entre tempo de incubação e atividade.

FIGURA 7: Influência do tempo de incubação na atividade da fração precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação.

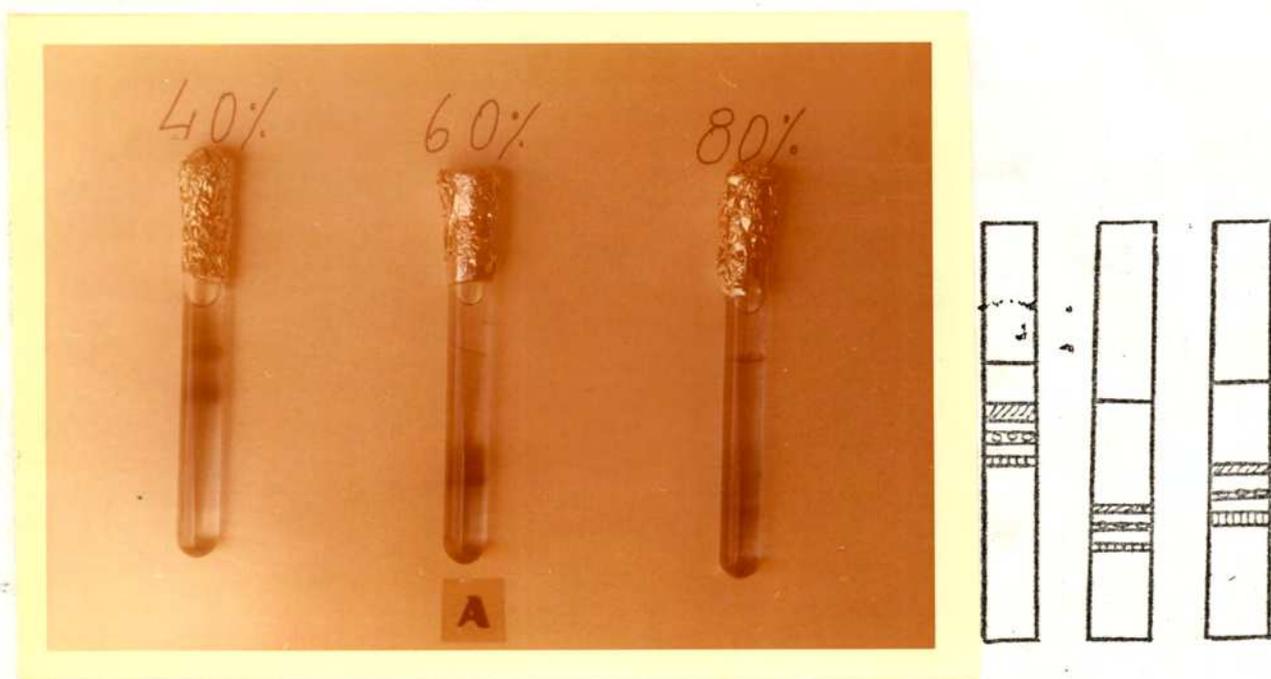
A atividade foi medida no precipitado obtido de 132 ml de filtra do enzimático, que foi dialisado e o volume completado a 75 ml. A mistura de reação continha: 0,5 ml da solução enzimática, 1,25 ml de tampão McIlvaine no pH 7,8 e 1,25 ml da suspensão de xilana a 1%. Após incubação por 5 - 15 - 25 - 35 - 45 e 55 minutos na temperatura de 50°C, a reação foi interrompida com ácido dinitrosalicílico (2,0 ml) para a determinação de glicídeos redutores (expressos em miligramas de xilose).



5.13.6. - Comportamento eletroforético das xilanases produzidas por Aspergillus sp (cor verde clara).

As frações obtidas por fracionamento com sulfato de amônio a 40 , 60 e 80% de saturação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrando-se constituídas de pelo menos três componentes como está indicado na fotografia e gráfico da figura 8.

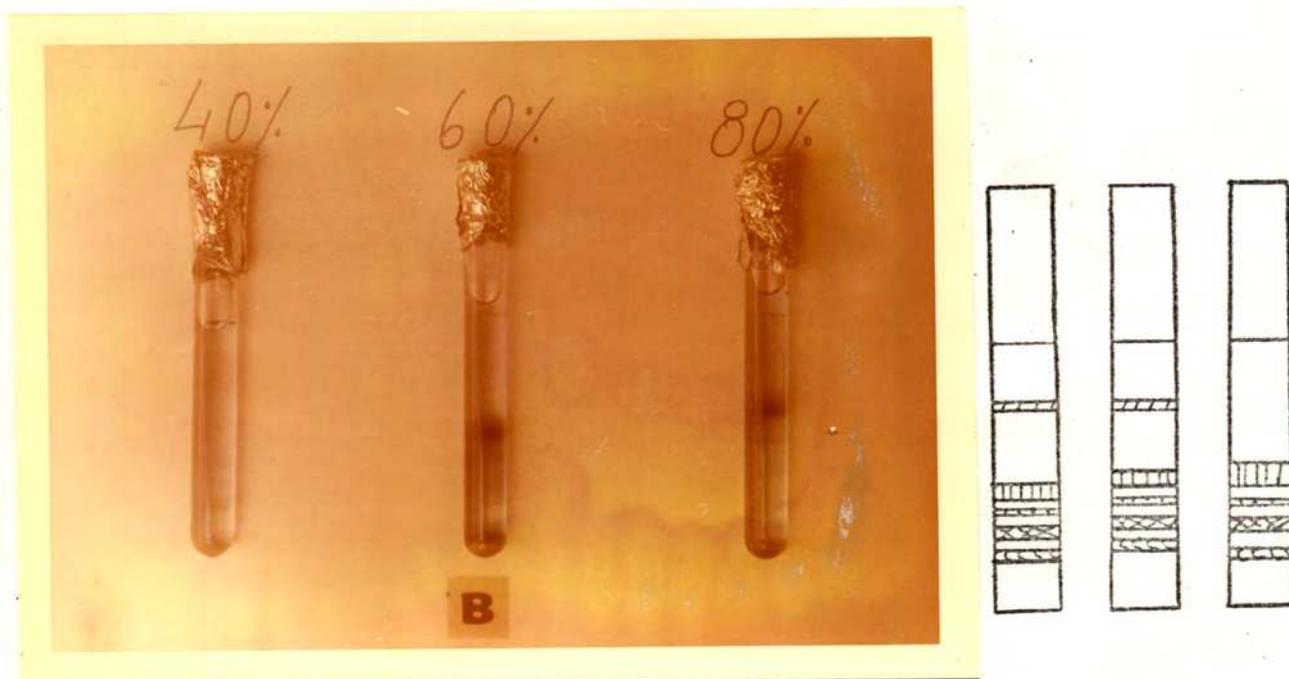
FIGURA 8 : Comportamento eletroforético em gel de poliacrilamida das frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação do caldo enzimático produzido por Aspergillus sp (cor verde clara).



5.13.7. - Comportamento eletroforético das xilanases produzidas por Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp.

As frações dialisadas e liofilizadas provenientes das precipitações a 40, 60 e 80% de saturação com sulfato de amônio fornecidas pelo fungo Geotrichum sp, quando submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida mostraram-se constituídas de 5 componentes no caso das precipitações com 40 e 60% de saturação, enquanto que, na fração precipitada com 80% de saturação apareceram apenas quatro componentes, como está indicado na fotografia e no gráfico da figura 9.

FIGURA 9 : Comportamento eletroforético em gel de poliacrilamida das frações oriundas das precipitações a 40 ,60 e 80% de saturação com sulfato de amônio das preparações do fungo Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp.



6. DISCUSSÃO

6.1. - EXTRAÇÃO DA XILANA DA CASCA DE ARROZ

Os valores referidos no quadro 1, mostraram que, pela metodologia usada, obteve-se um valor porcentual de xilana, na casca de arroz, baixo em comparação aos valores encontrados em outros vegetais. Estudos efetuados sobre presença de xilana em sabugo de milho, cascas de outros cereais e seus talos apresentaram teores variáveis entre 15 e 30% (54).

Entretanto, quando se fez extração direta, como indicada em 5.4, obteve-se uma quantidade maior do que a obtida no processo anterior embora o material assim extraído se apresentasse com um teor de resíduo mineral fixo mais alto.

As diferenças de coloração e aspecto notadas na secagem da casca de arroz, pelo uso de aquecimento à baixa temperatura, da dessecação e da liofilização são apenas visuais pois as xilanas secadas por estes processos apresentavam as mesmas características físicas aparentes, quando trituradas e homogeneizadas.

6.2.- CARACTERIZAÇÃO DA XILANA BRUTA QUANTO AO RESÍDUO MINERAL FIXO (CINZAS)

As quantidades de cinzas totais aparecem nos quadros 2 e 3 respectivamente. Os dados mostraram que, a quantidade de resíduo mineral fixo encontrado na xilana extraída pelo processo usado para o sabugo de milho é consideravelmente menor que a encontrada na xilana extraída pelo processo de extração direta. Ambas possuem grande quantidade de silicatos o que foi notado pela determinação da solubilidade desse resíduo. Segundo a literatura, a quantidade de cinzas totais encontradas na xilana do sabugo de milho é de 0,45 g% (50), sendo que, a quantidade encontrada nas xilanas da casca de arroz foi significativamente maior, 0,76 g% e 7,06 g% respectivamente, pelo processo de extração do sabugo de milho e pelo processo direto.

A grande diferença entre os teores de cinzas existentes nas xilanas estudadas provavelmente se deve a maior solubilização e perda de

sais durante as extrações aquosas e em solventes orgânicos que foram efetuadas na extração da xilana pelo processo do sabugo de milho.

6.3.- PURIFICAÇÃO PARCIAL DA XILANA BRUTA EXTRAÍDA DA CASCA DE ARROZ

A purificação parcial da xilana extraída da casca de arroz, resultou em um produto final com melhores características de apresentação em relação à xilana bruta. A recuperação após o processo de purificação foi em média de 66%, em relação ao produto bruto.

6.4.- HIDRÓLISE ÁCIDA E ENZIMÁTICA DA XILANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Os estudos da hidrólise ácida das xilanas obtidas pelos 2 processos usados para sua extração da casca de arroz foram realizados em comparação com o da xilana da madeira de lariço nº X-3875 lote 62-C-2820 da firma Sigma U.S.A. Os resultados obtidos, mostrados no quadro 4, evidenciam que o rendimento em açúcares redutores, expressos em xilose, das xilanas da casca de arroz podem ser maiores do que os obtidos nas mesmas condições para a xilana da madeira. A identificação da xilose nos hidrolisados foram realizadas por cromatografia em placa delgada e de papel sendo que os diversos produtos hidrolisados nas condições citadas apresentaram xilose.

Observou-se que os produtos de hidrólise provenientes da ação enzimática da xilanase estudada só apresentaram xilose quando foram submetidos a uma hidrólise ácida posterior, o que significa que esta enzima nos fornece xilo-oligossacarídeos facilmente desdobráveis em xilose por soluções ácidas.

Para cálculo da pureza relativa das xilanas extraídas pelos dois processos, tomou-se a xilana extraída pelo processo descrito para o sabugo de milho como 100% pura. Em relação a esse grau de pureza e com base nos glicídeos redutores produzidos pela hidrólise ácida a frio, encontrou-se um grau de pureza de 57,04% para a xilana extraída pelo processo direto. Contudo, como a extração pelo processo direto foi de 20 g% contra 7,4 g% para o processo do sabugo de milho, concluiu-se que a extração de xilana pelo processo direto foi de aproximadamente 1,5 vezes maior.

6.5. - PRODUÇÃO DA XILANASE PELOS FUNGOS

Os resultados contidos no quadro 5 mostram que diferenças de aeração no meio de cultura contendo os fungos Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp, alteram sua produção enzimática sem impedir que eles a produzam.

Ainda no quadro 5 podemos observar que as oscilações de temperatura (entre 22 e 30°C) não impedem que as culturas fúngicas acima citadas atinjam o máximo de produção enzimática.

Os quadros 5 e 7 mostram que a produção enzimática, é independente de alterações na aeração, temperatura e meios de cultura, obedecendo a ciclos periódicos com máximos de produção seguidos de mínima produção enzimática, o que sugere a hipótese de que este comportamento poderá estar relacionado ao ciclo vital dos fungos estudados.

Também é possível que a presença de grandes quantidades de xilanase exerça ação inibidora sobre a capacidade de produção da mesma pelos fungos.

A máxima atividade enzimática dos fungos estudados foi 8,2, expressa em miligramas de "xilose" fornecida por 1 ml da preparação enzimática, obtida no 27º dia de incubação do fungo Aspergillus sp (cor verde clara) em meio adequado. Em condições semelhantes o fungo Chaetomium trilaterale produziu um máximo de 7,5 mg de xilose, sendo considerado excelente produtor de xilanase, como é citado na literatura (30, 33).

6.6. - PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS

Somando-se as atividades das 3 frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação, apresentada no quadro 6, referentes ao fungo Geotrichum sp verificou-se uma perda de 54,70% de atividade, por esta purificação parcial, observando-se ainda que as perdas referentes ao fungo Aspergillus sp (cor verde clara) foram de 62,06%. Isto demonstra a não efetividade do fracionamento pelo sulfato de amônio, nas condições usadas. Assim tentou-se fazer uma precipitação do filtrado do meio de cultura com sulfato de amônio a 80% de saturação procurando obter melhores resultados com

diminuição das perdas que estão entre 58 - 44% (quadros 9 e 10). Assim, seria mais conveniente trabalhar com o filtrado do meio de cultura (solução enzimática bruta) desde que se pudesse conservá-lo em boas condições.

Quanto ao fracionamento produzido pela precipitação com sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação verificamos ser vantajoso para o Geotrichum sp em relação a atividade específica pois a fração precipitada com 40% de saturação apresentou atividade específica bem mais alta do que as outras frações. O mesmo, entretanto, não ocorreu quando se fez idêntico fracionamento para o Aspergillus sp (cor verde clara).

Com o objetivo de aumentar o grau de purificação e o rendimento, tentou-se o uso de outros agentes precipitantes como etanol, metanol e acetona, em diferentes proporções com a finalidade de comparar os resultados obtidos com os encontrados no fracionamento pelo sulfato de amônio. Assim, apreciando-se os resultados (quadro 10) verificou-se que apenas o precipitado de etanol (1:1 v/v) e do metanol (2:1 v/v) apresentaram melhor grau de pureza em relação ao precipitado do sulfato de amônio. Também observou-se que o sulfato de amônio permitiu a recuperação de maior porcentagem da atividade enzimática total que qualquer um dos outros agentes precipitantes usados.

6.7. - ESTUDO DE ALGUMAS PROPRIEDADES DA XILANASE

6.7.1. - Influência do pH

O valor encontrado para o máximo de atividade, pH ótimo, foi de 7,8 mostrado na figura 3. Esse valor não se enquadra dentro da faixa referida na literatura para várias xilanasas fúngicas já estudadas (21,29,33,51), apresentando-se, entretanto, próxima da faixa referida para o Bacillus firmis cujo pH ótimo é 7,2 (29) e do Bacillus alkalophilic N° C-59-2 em que o melhor pH se situa na faixa de 6,0 a 8,0 (27).

6.7.2. - Influência da concentração do substrato.

É interessante observar que a relação velocidade da rea

ção enzimática em função do substrato, apresentado na figura 4, foge da cinética clássica de Michaelis-Menten cuja curva seria uma hipérbole retangular. A curva obtida para a xilanase mostra um aspecto sigmoidal, sugerindo que esta enzima não deve obedecer as equações da cinética deduzidas originalmente por Michaelis-Menten (39).

Normalmente, as enzimas que apresentam curvas sigmoidais em função do substrato são enzimas de estruturas complexas formadas de mais de um polipeptídeo e apresentando na molécula mais de um centro catalítico e outros centros de ligação de inibidores ou ativadores, que são chamados efetores alostéricos.

A ligação do substrato a um centro ativo, modifica a configuração espacial da molécula da enzima, ativando progressivamente os demais centros catalíticos de forma que a relação entre atividade e concentração de substrato não é linear. O efeito da ligação desses efetores aos centros de ligação na superfície da enzima é chamado de efeito alostérico e poderá ser positivo (ativador) ou negativo (inibidor). O gráfico apresentado na figura 4, mostra o mesmo comportamento referido para as hidrolases de Aspergillus niger (13).

6.7.3. - Influência da concentração da enzima.

Na figura 5 verificou-se proporcionalidade entre concentração e atividade sendo que em maiores concentrações enzimáticas a velocidade da reação catalítica aumentou consideravelmente.

6.7.4. - Influência da temperatura.

O máximo de atividade mostrado pela curva de temperatura (figura 6) coincidiu com os valores encontrados para xilanase produzida pelo fungo Chaetomium trilaterale linhagem nº2264 (33). Deve-se notar (figura 6) que a enzima é rapidamente inativada a temperaturas superiores a 55°C.

6.7.5. - Influência do tempo de incubação.

Verificou-se não linearidade da velocidade da reação com o tempo (5 a 55 minutos). Isto poderá ser devido a dois fenôme-

nos : a) desnaturaçãõ da enzima com o tempo, uma vez que a temperatura ótima para atividade da xilanase é relativamente alta (50 a 55°C); b) inibiçãõ parcial da enzima pelo acúmulo de produtos da reação enzimática.

6.8. -- COMPORTAMENTO ELETROFORÉTICO

O comportamento eletroforético da enzima do fungo Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp diferiu do apresentado pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara), quanto ao número de componentes nos precipitados com 40, 60 e 80% de saturação com sulfato de amônio e também quanto à distância de migração ou mobilidade, o que sugere serem enzimas com características diferentes.

7. CONCLUSÕES

As principais conclusões derivadas do presente trabalho, foram as seguintes:

- 7.1. - Há possibilidades de se extrair a xilana da casca de arroz diretamente com bons resultados, apresentando perspectivas econômicas devido à rapidez, simplicidade e baixo custo operacional.
- 7.2. - O método de extração da xilana do sabugo de milho não apresenta bons resultados quando aplicado à casca de arroz, porque proporciona grande perda deste polissacarídeo, além de ser um processo lento, complexo e dispendioso.
- 7.3. - A precipitação da xilana, quando isolada da hemicelulose, pode ser efetuada com ácido acético concentrado, em lugar de solução a 50%, com agitação contínua do meio na presença de gelo, sem afetar a xilana obtida, com a vantagem de redução do volume final.
- 7.4. - Consegue-se centrifugar a xilana, quando precipitada por ácido acético em rotações mais baixas do que as recomendadas pelo método usado para o sabugo de milho (40.000 r.p.m. em centrifugação contínua). Os mesmos resultados foram obtidos usando-se uma força centrífuga de 400 x g por 4 hs. (2.000 r.p.m.) em condições de refrigeração.
- 7.5. - A extração alcalina da xilana da casca de arroz libera a celulose que poderá ser usada na indústria, sem os inconvenientes encontrados na casca integral. Isto é, atualmente, importante devido às dificuldades existentes na produção dessa matéria prima.
- 7.6. - Há predominância de sais alcalinos, em especial, silicatos na xilana extraída da casca de arroz, principalmente, na extraída pelo processo direto.
- 7.7. - A ação de soluções ácidas a frio não é efetiva para a hidrólise

se das xilanas estudadas.

- 7.8 - Dentre os três fungos (Geotrichum sp e as duas formas de Aspergillus sp) a maior produção enzimática foi verificada no meio contendo Aspergillus sp (cor verde clara), considerado excelente produtor de xilanase.
- 7.9 - Pequenas oscilações de temperatura ($\pm 8^{\circ}\text{C}$) não alteram a produção enzimática pelos fungos estudados.
- 7.10- A precipitação por sulfato de amônio permite uma recuperação muito baixa (ao redor de 50%) da atividade enzimática tanto a partir do extrato de Geotrichum sp quanto do Aspergillus sp.
- 7.11- Não houve purificação aparente no fracionamento do extrato de Aspergillus sp (cor verde clara), pela precipitação com 40, 60 e 80% de saturação do extrato bruto com sulfato de amônio.
- 7.12- As diferenças existentes nas propriedades enzimáticas após fracionamento com sulfato de amônio e no comportamento eletroforético das enzimas provenientes dos fungos Geotrichum sp contaminado com Penicillium sp e Aspergillus sp (cor verde clara) mostraram que essas enzimas apresentam características próprias e diferentes.
- 7.13- Os agentes precipitantes (etanol, metanol e acetona) foram menos eficientes do que o sulfato de amônio na precipitação da xilanase estudada, embora os precipitados do etanol e metanol apresentassem maior grau de pureza.
- 7.14- As perdas enzimáticas verificadas na precipitação com os diferentes agentes precipitantes (sulfato de amônio, etanol, metanol e acetona) não significaram destruição da enzima, sendo que a atividade precipitada permaneceu no sobrenadante respectivo.
- 7.15- A enzima fornecida pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara) não produz xilose detectável como produto enzimático, mas, xilo -

oligossacarídeos facilmente decomponíveis a xilose quando submetidos a hidrólise ácida a quente.

- 7.16- As condições ótimas para a atividade da fração enzimática proveniente da precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e produzida pelo fungo Aspergillus sp (cor verde clara), são pH 7,8, temperaturas entre 50 e 55°C e concentração de xilana a 0,8%.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, G.A. - Constitution of an acidic xylan from tamarack (Larix laricina). Can. J. Chem. 38: 2402-2409, 1960.
2. ADAMS, G.A. - Xylans. In: Methods in Carbohydrate Chemistry. New York and London, Academic Press, 1965. v.5: p. 172-175.
3. ASPINALL, G. O. & CARTER, M. E. - The constitution of a xylan from Norway spruce (Picea excelsa). J. Am. Chem. Soc. 3: 3744-3748, 1956.
4. ASPINALL, G. O. ; GREENWOOD, C. T. & STUGEON, R. J. - The degradation of xylans by alkali. J. Chem. Soc. 3667-3674, 1961.
5. ASPINALL, G. O. ; CARTER, M. E. & LOS, M. - The degradation of xylobiose and xylotriose by alkali. J. Am. Chem. Soc. 4: 4807-4810, 1956.
6. ASSUMPÇÃO, R. M. V. & MORITA, T. - Solução tampão de McIlvaine. In: Manual de Soluções, Reagentes & Solventes. São Paulo, Edgar Blucher, 1968. p. 275.
7. BACILA, M. - Tabela de saturação por sulfato de amônio. In: Curso de Fisiologia de Microrganismos. Paraná, Imp. Tip. I.B.P.T., 1960. p.205.
8. BARRY, V. C. ; McCORMICK, J. E. & MITCHELL, W. D. - Properties of periodate-oxidised polysaccharides. Part III. Estimation of aliphaglycol groupings in a polysaccharide. J. Am. Chem. Soc. 76: 3692-3696, 1954.
9. BENETT, E. - Effect of aqueous perchloric acid on the xylan content of holocellulose from cornstalks. Plant Physiol. 30: 562, 1955.
10. BERNFELD, P. - The biogenesis of carbohydrates. In: Biogenesis of Natural Compounds. New York, 1963. p. 304-306.
11. BUTTERWORTH, J. P. ; BEL, S. E. & GARVOCK, M. G. - Isolation and properties of the xylan-fermenting bacterium 11. Biochem. J. 74: 180-182, 1960.
12. CHANDA, S. K. ; HIRST, E. L. & PERCIVAL, E. G. V. - The constitution of a pear cell-wall xylan. J. Chem. Soc. 1240-1246, 1951.

13. CLARKE, A. E. & STONE, B. A. - Properties of a β -(1 \rightarrow 4)-Glucan Hydrolase from Aspergillus niger. Biochem. J. 96: 802, 1965.
14. CROON, I & TIMEL, T. E. - Distribution of substituents in a partially methylated xylan. J. Am. Chem. Soc. 82: 3416-3417, 1960.
15. DAWSON, R. M. C. ; ELLIOTT, D. C. ; ELLIOTT, W. H. & JONES, K. M. - Xylan. In: Data Biochemical Research. 2nd ed. Oxford, Claredon Press, 1969. p. 472-473.
16. DISCHE, Z. - Determination of the carbohydrates in animal organs and in blood by characteristic color reactions. I Color reactions of the carbohydrates and their use in the microchemical determination of different sugars. Mikrochemie 7: 33-68, 1929.
17. DUTTON, G. G. S. & UNRAU, A. M. - The constitution of a synthetic xylan. Can. J. Chem. 40: 1479-1482, 1962.
18. ETTEN, H. D. van & RATEMAN, O. F. - Enzymatic degradation of galactan, galactomannan and xylan by Sclerotium rolfsii. Phytopathology 59: 968-972, 1969.
19. FLORKIN, M. & STOTZ, E. H. - List of enzymes. In: Comprehensive Biochemistry. 2nd ed. New York, Elsevier Publishing Company, 1965. p. 136-142.
20. FLORKIN, M. & STOTZ, E. H. - Pentoglycans. In: Comprehensive Biochemistry. New York, Elsevier Publishing Company, 1963. v 5: p. 223-224.
21. FUKUI, S. - Degradation of xylan by the xylanase system of Aspergillus oryzae, n^o 8. J. Gen. Appl. Microbiol. 4: 39-49, 1958.
22. FUKUI, S. ; SUZUKI, T. ; KITAHARA, K. & MIWA, T. - Studies on β -1,3-Xylanase I. Existence of a new enzyme, β -1,3-xylanase. J. Gen. Appl. Microbiol. 6: 270, 1960.
23. FREI, E. ; PRESTON, R. D. & S. F. R. - Non cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. I. Xylan in siphonous green algae. Proc. Roy. Soc. (London) ser. B 160 p. 293, 1964.
24. GORDON, A. H. - Electrophoresis in polyacrylamide gel. In: Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.

North-Holland, 1969. p. 52-55.

25. HOCHSTER, R. M. & WATSON, R. W. - Enzymatic Isomerization of D-Xylose to D-Xylulose. Arch. Biochem. Biophys. 48: 120-128, 1954.
26. HOWARD, B. H. ; JONES, G. & PURDOM, M. R. - The pentosanases of some rumen bacteria. Biochem. J. 74: 173-180, 1960.
27. HORIKOSHI, K. & ATSUKAWA, Y. - Xylanase produced by Bacillus alkalophilic n° C-59-2. Agr. Biol. Chem. 37: 2097-2103, 1973.
28. HRAZDINA, G. & NEUKOM, H. - Isolation of a xylanase from a commercial cellulase preparation. Biochem. Biophys. Acta 128: 402-403, 1966.
29. IISUKA, H. & KAWAMINAMI, T. - Studies on the xylanase from Streptomyces. Part.I. Purification and some properties of xylanase from Streptomyces xylophagus nov. sp. Agr. Biol. Chem. 29: 520-524, 1965.
30. IISUKA, H. & KAWAMINAMI, T. - Studies on xylanase from microorganisms and the identification of new species of Streptomyces. Agr. Biol. Chem. 33: 1257-1263, 1969.
31. INAOKA, M. & SODA, H. - Crystalline xylanase. Nature 178: 202-203, 1956.
32. INOUE, M. ; OKADA, S. & FUKUMOTO, J. - Juice-clarifying enzymes. I. Accelerating factor for clarification of cloudy citrus juices Abstract of annual meeting of agricultural & Chem. Soc. Japan 137, 1967.
33. KAWAMINAMI, T. & IISUKA, H. - Studies on xylanase from microorganisms. (IV) Action of xylanase of Chaetomium trilaterale strain n° 2264 upon xylan. J. Ferment. Technol. 48: 161-168, 1970.
34. KAWAMINAMI, T. & IISUKA, H. - Studies on xylanase from microorganisms. Part III. Production of xylanase by Streptomyces xilophagus nov. sp. Agr. Biol. Chem. 33: 1787-1789, 1969.
35. KING, N.,J. & FULLER, D. B. - The xylanase system of Coniophora cerebella Biochem. J. 108: 571-576, 1968.
36. LEDERER, E. & LEDERER, M. - Cromatografia sobre papel de los azúcares. In: Cromatografia. Revision de sus principios y aplicaciones. 2ⁿ ed. Buenos Aires, El Ateneo edito -

- rial, 1960. p. 269-270.
37. LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. - Protein measurement with the Follin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951. .
 38. MANNERS, D. J. & MITCHELL, J. P. - The fine-structure of Rhodymenia palmata xylan. *Proc. Biochem. Soc.* p. 92, 1963.
 39. MICHAELIS, L. & MENTEN, M. L. - Kinetics of Invertase Action. *Biochem. Z.* 49: 333-369, 1913.
 40. MACHEBOEUF, M. ; MUNIER, R. & ALLOUF, R. - Revelateurs des al doses. In: *Techniques de Laboratoire.* 2nd ed. Paris, Masson et Cie editeurs, 1954. p. 367.
 41. NAKANO, M. ; PORTUGAL, M. C. S. A. ; NARIMATSU, M. N. & CHIARELLI, V. - Avaliação do uso de enzimas em rações destinadas às aves de corte. *Atualidades Veterinárias.* Nº 9. p.38, 1973.
 42. PARK, Y. K. & TOMA, M. - Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 20: 67-69, 1974.
 43. ROELOFSEN, P. A. - Some notes on xylan crystals. *Biochem. Biophys. Acta* 13: 592-593, 1954.
 44. SÃO PAULO. SECRETARIA DA SAÚDE - Determinação de cinzas. In: *Normas de Qualidade para Alimentos.* São Paulo, Imp. Instituto Adolfo Lutz, 1966. 1: CDU 543.1 - 543.4.
 45. SEPTON, H. H. - Separation and determination of the hydrolysis products of a methylated xylan as their trimethylsilyl derivatives by vapor phase chromatography. *J. Org. Chem.* 29: 3415-3416, 1964.
 46. SORENSEN, H. - Enzymatic hydrolysis of xylan. *Nature* 172: 305-306, 1953.
 47. SUMNER, J. B. - The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *J. Biol. Chem.* 62: 287-290, 1924-1925.
 48. WALKER, D. J. - Some properties of xylanase and xylobiase from mixed rumen organisms. *Aust. J. Biol. Sci.* 20: 799-808, 1967.
 49. WHISTLER, R. L. ; CHANG, P. K. & RICHARDS, G. N. - Alkaline degradation of periodate oxidized xylan and dextran. *J.*

- Am. Chem. Soc. 81: 4058-4060, 1959.
50. WHISTLER, R. L. & CORBETT, W. M. - Behavior of xylan in alkaline solution : the isolation of a new C-5 saccharinic acid. J. Am. Chem. Soc. 78: 1003-1005, 1956.
 51. WHISTLER, R. L. & MASAK, E. , Jr. - Enzymatic hydrolysis of xylan. J. Am. Chem. Soc. 77: 1241-1243, 1955.
 52. WHISTLER, R. L. & TU, C. C. - Isolation and properties of a series of crystalline oligosaccharides from xylan. J. Am. Chem. Soc. 74: 3609-3612, 1952.
 53. WHISTLER, R. L. & CORBETT, W. M. - Polysaccharides : Part I. In: The Carbohydrates Chemistry - Biochemistry Physiology. New York, Academic Press, 1957. p. 665-670.
 54. WHISTLER, R. L. - Xylan. In: Advances in Carbohydrate Chemistry. Dep. Agric. Chem. Purdue Univ. , 1950. 5: 269-290.
 55. WHISTLER, R. L. ; BACHRACH, J. & BROWMAN, D. R. - Preparation and Properties of Corn Cob Holocellulose. Arch. Biochem. 19: 25, 1948.
 56. WHITAKER, J. R. - Effect of Temperature on Transformation of Enzyme Substrate Complex to Products. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences. New York, Marcel Dekker Inc., 1972. p. 331-348.