



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

MAX ADILSON LIMA COSTA

Lic. Química

**ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO COM ETANOL DE XILANASES DE
COMPLEXOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus niger* EM
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

CAMPINAS

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

MAX ADILSON LIMA COSTA

Lic. Química

**ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO COM ETANOL DE XILANASES DE
COMPLEXOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus niger* EM
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas

Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida pelo aluno Max Adilson Lima Costa e
orientada pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda

CAMPINAS

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

C823e Costa, Max Adilson Lima, 1971-
Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa / Max Adilson Lima Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Everson Alves Miranda.

Coorientador: Cristiane Sanchez Farinas.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Xilanases. 2. Precipitação. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Fermentação submersa. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Farinas, Cristiane Sanchez. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of precipitation with etanol xylanase enzyme complex produced by *Aspergillus niger* in solid-state fermentatio and submerged fermentation

Palavras-chave em inglês:

Xylanase

Precipitation

Solid-state fermentation

Submerged fermentation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Cristiane Sanchez Farinas [Coorientador]

Fabiana Regina Xavier Batista

André Bernardo

Aline Carvalho da Costa

Gisele Atsuko Medeiros Hirata

Data de defesa: 13-05-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de doutorado defendida por Max Adison Lima Costa e aprovada em 13 de maio de 2016
pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Farinas

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Presidente da Comissão Examinadora

Fabiana Regina Xavier Batista

Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista

André Bernardo

Prof. Dr. André Bernardo

Aline C. da Costa

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Gisele Atsuko

Dra. Gisele Atsuko Medeiros Hirata

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Manoel e Maria Amélia,
pelas suas escolhas, orações e ensinamentos.*

*Aos meus irmãos Zelinda, Zélia, Manoel
Augusto, Marcos, Zeila e Saskia, pelo apoio
e confiança depositada.*

*À minha esposa Eliziane e meus filhos Max
Jr. e Erick, pela compreensão e apoio
incondicional, vocês sempre foram a minha
inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas maravilhas realizadas em minha vida e por conduzir-me por toda essa jornada. Obrigado, Senhor, porque por puro amor me trouxe de tão longe e me deu a oportunidade de realizar esse sonho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Everson Alves Miranda pela convivência sadia durante todos esses anos, pela paciência, amizade, competência e extremo profissionalismo com que sempre conduziu o trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanches Farinas do Laboratório de Agroenergia da EMBRAPA de São Carlos-SP, pela imprescindível coorientação, participação e por toda a disponibilidade em colaborar que tornou possível a realização de grande parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. André Bernardo da Faculdade de Engenharia Química da UFSCAR pela participação efetiva nas tomadas de decisão durante o andamento do trabalho o meu muito obrigado.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Duran da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP, pela disponibilidade do laboratório para o início dos estudos de cultivo fúngico.

Ao Prof. Dr. João Sinézio de Carvalho Campos da FEQ/UNICAMP, pela disponibilidade em recuperar e tornar utilizável a nossa, quase obsoleta, bomba dosadora, indispensável nos estudos de precipitação em tanque agitado.

A colegas e amigos de laboratório Gisele Atsuko, Nemailla Bonturi, Gisele Pavan, Marina Pinheiro, Cristiane Amarin, Helberth Lopes e todos os outros do LEBp, LIMBIO e LEBC por toda ajuda disponibilizada.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno e à Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Morais da FEA/UNICAMP por manterem as portas dos seus laboratórios sempre aberta para nós.

À Prof^a. Msc. Naimy Farias de Castro que me introduziu ao mundo da pesquisa dando-me a primeira oportunidade como aluno de iniciação científica, meus eternos agradecimentos.

À Coordenação de Pós-graduação e todos os professores da Faculdade de Engenharia Química - FEQ/UNICAMP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de doutorado e à EMBRAPA, FAPESP e CNPq, responsáveis pela estrutura e aporte financeiro do Laboratório de Agroenergia e LEBp.

RESUMO

Estudos de precipitação de xilanases produzidas por diferentes microrganismos em fermentação em estado sólido ou fermentação submersa revelaram diferenças quantitativas e qualitativas entre os produtos obtidos. No caso da precipitação de xilanase com etanol, alta recuperação de atividade obtida apenas em concentrações elevadas de solvente. Devido à relevância das xilanases no cenário industrial, especialmente em um contexto biorefinaria, é importante caracterizar melhor a produção e a purificação destas enzimas. Portanto, o presente estudo investigou a precipitação, com etanol, de xilanases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido e submersa. O conceito de solutividade e o uso da técnica de semeadura foram aplicados com o objetivo de aumentar a recuperação da atividade e pureza. Estudos de estabilidade térmica e de pH dos complexos de xilanase revelaram que estas enzimas eram altamente estáveis na faixa de 15-45 °C e pH na faixa de 3,0-8,0. O delineamento experimental foi utilizado para avaliar os efeitos de temperatura, concentração de etanol e pH na recuperação de proteína total e atividade de xilanase. A temperatura apresentou efeito negativo sobre a recuperação da enzima, enquanto o pH e a concentração de etanol tiveram efeitos diferentes para a fermentação no estado sólido e submersa. Os perfis cinéticos mostraram que um período relativamente curto de tempo (até 15 minutos) era suficiente para se recuperar a maior parte da atividade de xilanase nas condições testadas (65 e 79% de recuperação da fermentação no estado sólido e submersa, respectivamente). Os estudos em tanque agitado permitiram a determinação de curvas de solutividade das xilanases e de solubilidade da proteína total em função da concentração de etanol. Estas curvas permitiram a determinação de uma condição aqui chamada de ponto de operação de corte (POC). A precipitação em duas etapas com base nestas curvas permitiu o enriquecimento do precipitado em termos de atividade de xilanase por um fator de cerca de 2. O uso da técnica de semeadura mostrou um efeito positivo sobre a precipitação, aumentando em até 21% da recuperação de atividade de xilanase, indicando que esta é uma técnica promissora a ser investigada.

ABSTRACT

Precipitation studies of xylanases produced by different microorganisms under solid-state fermentation or submerged fermentation have revealed quantitative and qualitative differences between the products obtained. In the case of xylanase precipitation with ethanol high activity recovery is obtained only at high concentrations of the solvent. Due to the relevance of xylanases in the industrial scenario, especially in a biorefinery context, it is important to better characterize the production and the downstream processing of these enzymes. Therefore, the present study investigated ethanol precipitation of xylanases produced under solid-state and submerged fermentation by *Aspergillus niger*. The concept of solutivity and the use of seeding was applied aiming to increase activity recovery and purity. Studies of thermal and pH stabilities of the xylanase complexes showed that these enzymes were highly stable in the range of 15-45 °C and pH in the range of 3.0-8.0. Experimental design was used to evaluate the effects of temperature, ethanol concentration and pH on the recovery of total protein and xylanase activity. Temperature had a negative effect on enzyme recovery while pH and ethanol concentration had a different effect for solid-state and submerged fermentation. The kinetic profiles showed that a relatively short time (up to 15 min) was sufficient to recover most of the xylanase activity under the conditions tested (65 and 79% recovery for solid-state and submerged fermentation, respectively). Studies in stirred tank allowed the determination of the xylanase solutivity and total protein solubility curves as function of ethanol concentration. These curves allowed the determination of a condition here called cutting operation point (COP). A two step precipitation based on this COP allowed the enrichment of the precipitate in terms of xylanase activity by a factor of about 2. The use of seeding showed a positive effect on the precipitation, increasing up to 21% the recovery of xylanase activity, indicating that this is a promising technique to be further investigated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Diagrama esquemático das etapas do trabalho.....	27
Figura 2.1: Representação esquemática de uma molécula de xilana mostrando diferentes grupos substituintes (adaptada de BEG et al., 2001).....	31
Figura 2.2: Representação esquemática da atuação das enzimas do sistema xilanolítico sobre uma molécula de xilana. Ac, Grupo acetil. (adaptado de POLIZELI, 2009).....	34
Figura 2.3 Agregação de proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas opostas em meio aquoso contendo solvente orgânico (adaptado de SCOPES, 1987).....	49
Figura 2.4: Esquema de classificação dos tipos de nucleação (Adaptado de MULLIN, 2001).....	56
Figura 2.5: Evolução do crescimento em espiral (MULLIN, 2001).....	60
Figura 2.6: Evolução do crescimento por nucleação bidimensional (Fonte: GIULIETTI et al., 2001).	61
Figura 2.7: Evolução do crescimento áspero (Fonte: GIULIETTI et al., 2001).....	61
Figura 3.1: Representação esquemática do sistema utilizado para os estudos de precipitação do fermentado enzimático em tanque agitado: 1. tanque de vidro; 2. impelidor; 3. banho termostatizado; 4. bomba dosadora e 5. sistema de resfriamento do etanol.....	73
Figura 3.2: Desenho esquemático que descreve o processo de produção da semente 1..	87
Figura 3.3: Desenho esquemático do processo de precipitação com utilização de semente 1.....	88
Figura 3.4: Desenho esquemático que descreve o processo de produção da semente 2	89
Figura 4.1: SDS-PAGE dos complexos de FES e FS de <i>A. niger</i> . Géis: (a) 12,5% e (b) 7,5% de acrilamida. Pistas: (1) FES com meio Mandels; (2) FES com solução de sulfato de amônio; (3) controle com meio Mandels; (4) controle com solução de sulfato de amônio; (5) FS com meio Mandels; (6) FS com solução de sulfato de amônio; (7) controle com meio Mandels; (8) controle com solução de sulfato de amônio. Marcadores de (a) baixas e (b) altas massas moleculares. Carga de proteína: 1,5 µg/pista.....	93
Figura 4.2: Cinética preliminar de precipitação de (A) proteínas e (B) xilanases dos fermentados de FES e fermentados de FS com etanol. Temperatura 30,0°C; pH 5,5; concentração de etanol 80% v/v.....	98

Figura 4.3: Gráficos de Pareto dos efeitos da temperatura, pH e concentração de etanol assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FES.....	101
Figura 4.4: Gráficos de Pareto dos efeitos da temperatura, pH e concentração de etanol assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FS.....	102
Figura 4.5: Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas (pH e concentração de etanol) assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FES.....	106
Figura 4.6: Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas (pH e concentração de etanol) assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FS.....	107
Figura 4.7: Gráficos de superfícies de resposta da precipitação dos complexos enzimáticos de <i>A. niger</i> com etanol pela variação da concentração de etanol e do pH inicial do meio. a) recuperação de atividade de xilanase e de proteínas em FES, b) recuperação da atividade de xilanase e de proteínas em FS.....	110
Figura 4.8: Cinética de precipitação com etanol de complexos enzimáticos de <i>A. niger</i> produzidos em FES. Médias de duplicatas. Amplitudes máximas: 7,7% para atividade de xilanase e 9,8% para concentração de proteínas. Atividade xilanásica inicial, 4,15 UI.mL ⁻¹ ; concentração de proteínas inicial, 0,23 mg.mL ⁻¹ . Condições de precipitação: temperatura de incubação 15°C; pH 5,5; concentração de etanol final, 85%. Adição de etanol a -7,0°C.....	113
Figura 4.9: Cinética de precipitação com etanol de complexos enzimáticos de <i>A. niger</i> produzidos em FS. Médias de duplicatas. Amplitudes máximas: 6,7% para atividade de xilanase e 6,7% para concentração de proteínas. Atividade xilanásica inicial, 7,68 UI.mL ⁻¹ ; concentração de proteínas inicial, 0,12 mg.mL ⁻¹ . Condições de precipitação: temperatura de incubação 15,0°C; pH 5,5; concentração de etanol final, 85%. Adição de etanol a -7,0°C.....	113
Figura 4.10: Variações da solubilidade aparente (a) e solutividade de xilanases (b) dos fermentados em função da concentração de etanol. Condições de precipitação: pH 5,5; temperatura, 4,0°C; agitação de 150 rpm. Etanol a 5,0°C adicionado a 2,0 mL.min ⁻¹ . Referências: Concentração de proteínas inicial, 0,096 mg.mL ⁻¹ ; atividade de xilanase inicial, 9,180 UI.mL ⁻¹ . As barras representam os desvios padrão de quatro experimentos.....	119
Figura 4.11: Variação da solubilidade aparente (S) e da solutividade de xilanases (Stv), em termos percentuais, dos fermentados em função da concentração de etanol (v/v). Condições de precipitação: pH 5,5; temperatura 4,0°C e agitação de 150 rpm. Etanol a 5,0°C adicionado na vazão de 2,0 mL.min ⁻¹ . Referências: Concentração de proteínas inicial, 0,096 mg.mL ⁻¹ ; atividade de xilanase inicial, 9,180 UI.mL ⁻¹ . As barras representam os desvios padrão de quatro experimentos.....	121

Figura 4.12: Cinética da concentração de proteínas (◆) e da atividade de xilanase (◇) recuperadas, em termos percentuais, após a precipitação do fermentado com etanol em diferentes tempos de incubação com etanol a: a) 60%, b) 65%, c) 70%, d) 80%, e) 85% e f) 90%. As barras representam os desvios padrão das triplicatas dos experimentos. Condições: pH, 5,50; temperatura, 4,0°C; agitação, 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0°C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹..... 123

Figura 4.13: Determinação visual do ponto de turvação do fermentado de FS pela a adição de etanol. Condições: pH inicial do fermentado 5,5; temperatura de 4,0 °C e agitação de 150 rpm. Adição de etanol a 5,0 °C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹..... 127

Figura 4.14: Precipitação de xilanases com uso de semente. Comparativos entre os experimentos controle (◆) com: a) semente 1- 1,5%, etanol 51% (◇); b) semente 1- 3,0%, etanol 51% (◇); c) semente 1- 1,5%, etanol 48% (◇), d) semente BSA- 1,5%, etanol 48% (◇) e e) semente 2- 1,5%, etanol 48% (◇). As barras representam os desvios padrão dos valores obtidos em triplicata. Atividade de xilanase inicial dos fermentados nos experimentos: controle, 9,30 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (51% etanol), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0 (51% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (48% etanol), 8,31 UI.mL⁻¹; semente BSA- 1,5% (48% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 2- 1,5% (48% etanol), 10,17 UI.mL⁻¹. C_{EtOH}, concentração de etanol quando da adição da semente..... 132

Figura 4.15: Percentual de atividade de xilanase recuperada. Comparativos dos experimentos com semente: a) semente 1- 1,5%, etanol 51% (◆) e semente 1- 3,0%, etanol 51% (◇); b) semente 1- 1,5%, etanol 51% (◆) e semente 1- 1,5%, etanol 48% (◇); c) semente 1- 1,5%, etanol 48% (◆) e semente BSA - 1,5%, etanol 48% (◇), d) semente 1- 1,5%, etanol 48% (◆) e semente 2- 1,5%, etanol 48% (◇). As barras representam os desvios padrão dos valores obtidos em triplicata. Atividade de xilanase inicial do fermentado nos experimentos com: semente 1- 1,5% (51% etanol), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0 (51% etanol); 10,00 UI.mL⁻¹, semente 1- 1,5% (48% etanol), 8,31 UI mL⁻¹, semente BSA- 1,5% (48% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹, semente 2- 1,5% (48% etanol), 10,17 UI mL⁻¹..... 134

Figura 4.16: Curvas de solutividade de xilanases nos fermentados de *A. niger* nos experimentos controle e com a presença de sementes em função de diferentes concentrações de etanol..... 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Precipitação de xilanases por diferentes métodos.....	23
Tabela 2.1: Estrutura dos diferentes tipos de xilana. (adaptada de GÍRIO et al., 2010).....	32
Tabela 2.2: Características de xilanases de diferentes microrganismos. (adaptado de BEG et al., 2001).....	35
Tabela 2.3: Estudos de estabilidade térmica de xilanases.....	37
Tabela 2.4: Estudos de estabilidade de xilanases a diferentes valores de pH.....	38
Tabela 2.5: Estudos de obtenção de xilanases por FES e FS.....	42
Tabela 2.6: Características de enzimas com atividade xilanolítica produzidas por <i>A. niger</i> ...	45
Tabela 2.7: Constantes dielétricas a 20°C, da água e dos principais solventes orgânicos usados na precipitação de proteínas. (Fonte: LIDE, 2005).....	51
Tabela 2.8: Precipitação de xilanases por diferentes métodos.....	66
Tabela 3.1: Relação de reagentes utilizados nos ensaios.....	70
Tabela 3.2: Composição do meio de suplementação (Mandels e Weber, 1969).....	74
Tabela 3.3: Planejamento fatorial 2 ³ para precipitação em tubo de ensaio.....	81
Tabela 3.4: Planejamento composto central 2 ² para precipitação em tubo de ensaio.....	82
Tabela 4.1: Caracterização enzimática dos complexos produzidos por <i>A. niger</i> em FES e FS.....	91
Tabela 4.2: Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos da FES e da FS de <i>A. niger</i> a pH 5,0 por 3 h.....	94
Tabela 4.3: Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos da FES e da FS de <i>A. niger</i> a 30 °C por 3 h.....	95
Tabela 4.4: Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental fatorial 2 ³ : análise da atividade de xilanase e da concentração de proteínas dos complexos enzimáticos após a precipitação.....	99
Tabela 4.5: Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2 ² : análise da atividade de xilanase e da concentração de proteínas dos complexos enzimáticos de FES e de FS.....	105
Tabela 4.6: Coeficiente de valores e análise estatística para a concentração de proteína total e atividade de xilanase.....	109
Tabela 4.7: Cinética de precipitação dos fermentados de FES e de FS com etanol.....	112
Tabela 4.8: Comparativo de dados de precipitação de xilanases produzidas por FES.....	115
Tabela 4.9: Comparativo de dados de precipitação de xilanases produzidas por FS.....	116

Tabela 4.10: Variação da solubilidade aparente (S) e solutividade (S_{IV}) nos fermentados pela adição do etanol.....	118
Tabela 4.11: Cinética de recuperação de proteínas e atividade enzimática nos precipitados em diferentes concentrações de etanol.....	122
Tabela 4.12: Precipitação em duas etapas de xilanases do fermentado de <i>A. niger</i>	125
Tabela 4.13: Características dos sólidos utilizados como semente.....	128
Tabela 4.14: Precipitação do fermentado com a utilização de semente: Percentual de (P_R) proteínas e (X_R) atividade xilanásica recuperadas.....	130
Tabela 4.15: Solutividade (S_{IV}) das xilanases na precipitação com etanol do fermentado de <i>A. niger</i> com a utilização de semente.....	136
Tabela 4.16: Efetividade das sementes (η) na precipitação com etanol do fermentado de <i>A. niger</i> com a utilização de semente.....	137

NOMENCLATURAS

- $\%_E$ – percentual de etanol (v/v) na mistura
- a – atividade das espécies iônicas em solução.
- A – constante específica para cada substância
- a_{ativ} – coeficiente angular
- Ac – Grupo acetil
- A_E – atividade enzimática específica
- A_f – atividade enzimática do fermentado
- A_{ppt} – atividade enzimática da solução do precipitado dissolvido
- $\text{Ativ}|_0$ – coeficiente linear
- B – constante específica para cada substância
- BSA – albumina de soro bovino
- c – concentração da solução.
- C – concentração do soluto.
- C – constante específica para cada substância
- c^* – saturação de equilíbrio a uma dada temperatura.
- $C_{eq}(\infty)$ – solubilidade de cristais de tamanhos muito grandes.
- $C_{eq}(r)$ – solubilidade de cristais esféricos de raio r .
- C_i – concentração de soluto na interface solução-cristal.
- CMC – carboximetilcelulose
- D – coeficiente de difusão do soluto.
- D_E – densidade do etanol
- d_m – diâmetro molecular.
- DNS – ácido 3,5 dinitrosalicílico
- FDA – Food and Drug Administration
- FES – Fermentação em estado sólido
- F_p – Fator de purificação
- FS – Fermentação submersa

GRAS – generally regarded as safe

J – taxa de nucleação.

J_{het} – taxa de nucleação heterogênea.

k – constante de Boltzmann ($1,38066 \times 10^{-23}$ J/K).

kDa – kilodalton

k_N – constante de velocidade de nucleação.

K_{sp} – produto de solubilidade.

L – tamanho do cristal (comprimento da aresta ou diâmetro).

m_E – massa de etanol

m_f – massa final do conjunto

m_i – massa inicial do conjunto

n – ordem cinética de nucleação.

N^* – número de íons ou moléculas que formam o cristal.

PC – ponto central

PDA – batata, dextrose e Agar

P_f – concentração de proteínas no fermentado

pI – ponto isoelétrico

POC – ponto de operação do corte

P_{ppt} – concentração de proteínas na solução do precipitado dissolvido

P_R – proteínas recuperada

R – constante universal dos gases ($8,31451$ J/mol⁻¹.K⁻¹)

R^2 – coeficiente de correlação

S – supersaturação absoluta

S_{tv} – solutividade

$S_{tv\ c}$ – solutividade de xilanase sem o uso de semente (controle).

$S_{tv\ s}$ – solutividade de xilanas com o uso de semente.

T – temperatura absoluta (K)

t_{ind} – tempo de indução

UI – unidade internacional de atividade enzimática

$V_{amostra}$ – volume da amostra

V_{bat} – volume da batelada

V_E – volume de etanol adicionado
 V_f – volume do fermentado na batelada
 V_m – volume molar.
 V_{ppt} – volume de solução do precipitado dissolvido
 V_t – volume total da mistura.
 x_1 – fração molar do componente 1 na solução.
 X_R – Atividade xilanásica recuperada
 α_1 – atividade do componente 1.
 γ_1 – a coeficiente de atividade do componente 1.
 ΔG^* – variação da energia livre de Gibbs em função de N^* .
 ε – constante dielétrica
 η – efetividade da semente.
 μ_1^l – potencial químico do componente 1 na fase líquida.
 μ_1^s – potencial químico do componente 1 na fase sólida.
 π – produto das atividades das espécies em solução.
 ρ_c – densidade de cristal.
 σ – energia de superfície da fase sólida.
 Ω – fator de frequência pré-exponencial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Colocação do problema.....	25
1.2. Objetivo.....	26
1.3. Plano e etapas de trabalho desenvolvido.....	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
2.1. Aspectos gerais de hemicelulose, xilana e xilanase.....	30
2.1.1. Xilana: características, aplicação e degradação.....	30
2.1.2. Xilanases: características, aplicação e função.....	33
2.2. Técnicas de cultivo para produção de complexos enzimáticos.....	38
2.2.1. Fermentação em estado sólido (FES): características gerais.....	39
2.2.2. Fermentação submersa (FS): características gerais.....	40
2.2.3. Produção de xilanases por FES e FS.....	41
2.2.4. A espécie <i>Aspergillus niger</i>.....	43
2.2.5. Xilanases produzidas por <i>Aspergillus niger</i>.....	44
2.3. Precipitação de biomoléculas.....	46
2.3.1. Métodos de precipitação de proteínas.....	47
2.3.2. Precipitação por solventes orgânicos.....	48
2.3.3. Precipitação de proteínas com etanol.....	52
2.3.4. Mecanismo de formação de precipitados.....	54
2.3.4.1. Solubilidade e supersaturação como base para a formação dos precipitados.....	54
2.3.4.2. Nucleação.....	56
2.3.4.3. Crescimento de cristais.....	59
2.3.4.4. Maturação de Ostwald.....	62
2.3.4.5. Aglomeração.....	62
2.3.5. Utilização da técnica de semeadura em cristalização.....	64
2.3.6. Precipitação de xilanases.....	65

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
3.1. Materiais.....	70
3.1.1. Microrganismo e substrato sólido.....	70
3.1.2. Reagentes diversos.....	70
3.1.3. Materiais e equipamentos usados na produção e caracterização dos complexos enzimáticos.....	71
3.1.4. Materiais e equipamentos usados nos estudos de estabilidade térmica e de pH, determinação do ponto de turvação e precipitação em tubos de ensaio.....	72
3.1.5. Materiais e equipamentos usados nos estudos de precipitação em tanque agitado.....	72
3.2. Métodos.....	73
3.2.1. Escolha do meio de suplementação para a produção dos complexos enzimáticos.....	73
3.2.1.1. Preparação do inóculo.....	73
3.2.1.2. Preparação dos meios de cultivo.....	74
3.2.1.3. Fermentação em estado sólido (FES).....	75
3.2.1.4. Fermentação submersa (FS).....	75
3.2.1.5. Análise dos complexos enzimáticos.....	76
3.2.1.6. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelos complexos enzimáticos	77
3.2.1.7. Eletroforese SDS-PAGE dos complexos enzimáticos.....	78
3.2.2. Estudo da estabilidade térmica e de pH dos complexos enzimáticos.....	78
3.2.2.1. Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos.....	78
3.2.2.2. Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos.....	79
3.2.3. Estudos de precipitação em tubos de ensaio.....	79
3.2.3.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos com etanol em tubos de ensaio.....	79
3.2.3.2. Planejamento experimental fatorial 2^3 para as precipitações com etanol.....	80
3.2.3.3. Cinética preliminar de precipitação com etanol.....	81
3.2.3.4. Estudo da seleção de variáveis na precipitação dos complexos enzimáticos com etanol segundo planejamento experimental fatorial 2^3.....	81
3.2.3.5. Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2^2.....	82

3.2.3.6. Estudo cinético de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol baseado nos estudos com planejamento experimental.....	83
3.2.4. Estudos de precipitação do fermentado com etanol em tanque agitado.....	83
3.2.4.1. Determinação da solubilidade de proteínas e da solutividade de atividade xilanásica em função da concentração de etanol.....	83
3.2.4.2. Estudo de precipitação de xilanases em duas etapas.....	85
3.2.5. Precipitação com uso de semente.....	86
3.2.5.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos durante a adição de etanol em tanque agitado.....	86
3.2.5.2. Produção da semente 1.....	87
3.2.5.3. Precipitação com a presença de 1,5% de semente 1.....	87
3.2.5.4. Precipitação com a presença de 3,0% de semente 1.....	88
3.2.5.5. Precipitação com a adição de 1,5% da semente 1 abaixo do ponto de turvação.....	89
3.2.5.6. Preparação da semente 2.....	89
3.2.5.7. Precipitação com a presença de 1,5% de semente 2.....	90
3.2.5.8. Precipitação utilizando BSA como semente.....	90
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4.1. Escolha do meio de suplementação para FES e nutriente para FS adequado para a produção de enzimas por <i>A. niger</i>	91
4.2. Estudo da estabilidade térmica e de pH dos complexos enzimáticos.....	93
4.2.1. Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos.....	93
4.2.2. Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos.....	94
4.3. Estudos de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol.....	96
4.3.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos com etanol em tubos de ensaio.....	97
4.3.2. Cinética preliminar de precipitação com etanol.....	97
4.3.3. Estudo da seleção de variáveis na precipitação dos complexos enzimáticos com etanol segundo planejamento experimental fatorial 2^3 ...	98
4.3.4. Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2^2	104
4.3.5. Estudo cinético de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol baseado nos estudos com planejamento experimental.....	111

4.4. Estudos de precipitação do fermentado com etanol em tanque agitado.....	117
4.4.1. Determinação da solubilidade de proteínas da solutividade de atividade xilanásica em função da concentração de etanol para os fermentados de FS.....	118
4.4.2 Estudo de precipitação de xilanases em duas etapas.....	121
4.4.2.1 Estudo cinético de recuperação de proteínas e atividade xilanásica....	121
4.4.2.2 Precipitação de xilanases em duas etapas.....	124
4.5. Estudo de precipitação com uso de semente.....	126
4.5.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos durante a adição de etanol em tanque agitado.....	126
4.5.2. Produção e características das sementes.....	128
4.5.3. Precipitação com a presença de semente.....	128
5. DISCUSSÕES GERAIS.....	140
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	141
6.1. Conclusões.....	141
6.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	143
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

1. INTRODUÇÃO

A hemicelulose, segundo polímero mais abundante na natureza, funciona como uma ligação entre a lignina e a celulose. A hemicelulose tem uma estrutura complexa e mista formada por uma cadeia principal de xilana, xiloglucana, glucomanana, galactoglucomanana, arabinogalactana ou outros heteropolímeros. Quando comparada à celulose, a hemicelulose diferencia-se por não ser quimicamente homogênea e ter massa molecular menor (FENGEL e WEGENER, 1984; LAUREANO-PEREZ et al., 2005; MOTTA et al., 2013).

A xilana, o principal componente da hemicelulose, é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo β -1,4. O sistema enzimático que realiza a hidrólise da xilana é normalmente composto por um conjunto de enzimas hidrolíticas, conhecidas como xilanases, que atuam de forma sinérgica (AHMAD et al., 2013; JUTURU e WU, 2012). As xilanases são enzimas com potencial para a degradação de material da parede celular vegetal e sua ação na despolimerização da hemicelulose resulta na conversão da xilana em xilooligossacarídeos e xilose (AHMAD et al., 2013).

Dentre os microrganismos com potencial para a síntese de enzimas com atividade xilanásica, os fungos são a fonte mais frequente de hemicelulases como xilanases e glucanases (BAKALOVA et al., 1995; AHMAD et al., 2013). Xilanases microbianas são utilizadas em diversas indústrias, incluindo as de alimentos (panificação e clareamento de suco), cerveja, rações, têxteis, processamento de papel e na bioconversão de açúcares derivados de lignocelulose em combustível (AHMAD et al., 2013). Xilanases de diferentes fontes também diferem quanto as condições de temperatura, pH, etc., para o seu funcionamento ideal (PALMA, 2003; BEG et al., 2001). Em processos industriais, as enzimas que combinam um maior número de características extremofílicas tendem a ter um maior uso (MIELENZ, 2001; KANWAR e DEVI, 2013). A produção de xilanases, normalmente, é realizada por duas técnicas principais: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS)¹. Vantagens como a utilização

¹ Em bioquímica, fermentação é um termo geral para definir a degradação anaeróbica de glicose ou outros nutrientes orgânicos por organismos vivos para a obtenção de energia. Porém, neste trabalho utilizaremos o termo fermentação para definir o cultivo de microrganismo seja ele em meio sólido (FES) ou submerso (FS).

de resíduos agroindustriais ou outros materiais lignocelulósicos como substrato (CASTILHO et al., 2000), economia de espaço, alto rendimento de produção e baixo nível de contaminação, fazem da FES uma técnica atrativa (GAWANDE e KAMAT, 1999). Porém, a dificuldade no controle de algumas variáveis do processo (e.g., temperatura e transferência de massa) é uma das limitações dessa técnica. Já a FS oferece vantagens como a facilidade no controle de parâmetros como pH, O₂ dissolvido, troca de calor do sistema, o controle da fonte de carbono e retirada do produto para evitar a repressão catabólica (GONZÁLEZ et al., 2002). No entanto, produtos diluídos, fermentados de baixa estabilidade (MATSUMOTO et al., 2004) e geração de grandes volumes de resíduos líquidos são inconvenientes desse sistema (ELLAIHAH et al., 2002).

O interesse na produção e aplicação de xilanase tem aumentado pela sua importância, principalmente, na bioconversão de hemiceluloses em seus açúcares constituintes (GAWANDE e KAMAT, 1999). Entre os microrganismos com potencial para a produção de xilanases está o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, uma das fontes industriais capaz de produzir enzimas com atividade xilanásica, livres ou não de celulasas (BINOD et al., 2011). Esta espécie ganhou grande atenção devido à sua capacidade de secretar enzimas celulolíticas e tem sido bastante utilizada na produção, tanto por FES quanto por FS, de uma ampla variedade de enzimas, sendo a maioria das classes conhecidas como celulasas e xilanases (LIU et al., 2011; FARINAS et al., 2011; ARAQUE et al., 2007). Em muitas aplicações a presença de celulasas na mistura não afeta o processo ou produto e, em alguns casos, celulasas têm até um efeito sinérgico. No entanto, xilanases livres de celulasas também têm suas aplicações como no branqueamento de celulose para produção de papel (GAWANDE e KAMAT, 1999).

Em algumas aplicações o complexo enzimático pode ser utilizado diretamente ou de forma concentrada; em outros casos é necessário que a enzima seja separada do meio de cultivo. A precipitação é um método tradicional para tal, devido ao seu baixo custo e simplicidade operacional, sendo muito utilizada tanto em escala laboratorial quanto industrial para o processo de recuperação e purificação de proteínas. Isto porque, na maioria das vezes, o precipitado de proteínas formado é mais estável que o material em solução (BELL et al., 1983; CORTEZ e PESSOA JR, 1999). A precipitação é baseada na solubilidade da proteína a qual pode ser afetada por fatores como temperatura, pH da solução ou a presença de aditivos (COHN et al., 1946). Assim, uma proteína é feita insolúvel alterando a sua superfície ou alterando as características do solvente, sendo esta última estratégia preferida (ASENJO, 1990). Entre os principais métodos de

precipitação de proteínas estão a precipitação pela adição de sais (*salting-out*) polímeros não-iônicos, polieletrólitos, íons metálicos, solventes orgânicos e precipitação isoelétrica.

Diversos solventes orgânicos miscíveis em água, tais como etanol, metanol e acetona, são utilizados para precipitar enzimas. A adição desses solventes à solução proteica desencadeia uma variedade de efeitos, que combinados resultam na formação de precipitado. O efeito principal da adição de solventes orgânicos é a redução da atividade de água (CURLING, 1980). Por possuir características próprias como a variação gradativa da constante dielétrica e, principalmente, da atividade da água, a precipitação pela adição de solvente orgânico apresenta-se como um método refinado de fracionamento de proteína (BELL et al., 1983).

Xilanases de fontes variadas têm sido submetidas à precipitação para a concentração, purificação e caracterização bioquímica para a obtenção de enzimas com características específicas para cada aplicação (DO et al., 2013). A Tabela 1.1 apresenta trabalhos nos quais xilanases produzidas por vários microrganismos foram submetidas à precipitação por diferentes métodos. De maneira geral, os trabalhos mostram que enzimas com atividade xilanásica produzidas por diferentes microrganismos, apresentam características físico-químicas variadas e podem ser precipitadas por diferentes métodos, sendo que a extensão dessa precipitação, assim como a recuperação da atividade enzimática nos precipitados, varia de acordo com a característica ou a concentração do agente precipitante utilizado.

Dentre os trabalhos listados, alguns resultados de destaque são apresentados por Varma et al. (1999), Cortez et al. (1998) e Abirami et al. (2011). Neste primeiro trabalho no qual foi possível recuperar, de fermentados produzidos por *Chainia sp.*, 99,0% da atividade xilanásica com fator de purificação igual a 16,0 utilizando etanol como agente precipitante na concentração final de 80% v/v. Neste mesmo trabalho, obteve-se 93,5% da atividade recuperada com fator de purificação de 8,7 quando se utilizou acetona como agente precipitante na concentração final de 66,0% v/v. Cortez et al. (1998) recuperaram 100% da atividade xilanásica de complexos produzidos por *P. janthinellum* por precipitação com corte, a primeira etapa de precipitação (corte) foi feita com 40% de etanol, nesta etapa grande parte de proteínas que não eram xilanases foram precipitadas e removidas. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à segunda etapa de precipitação com 80% de etanol para recuperar as xilanases presentes. A precipitação com corte

Tabela 1.1: Precipitação de xilanas por diferentes métodos.

Microrganismo	Método de precipitação	X _R (%)	F _p	Referência
Sulfato de amônio (% m/v)				
<i>Penicillium glabrum</i>	90	84,2	3,3	KNOB et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	80*	27,0	-	FARINAS et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	70*	78,6	1,9	AHMAD et al., 2013
<i>Trichoderma viride</i>	60*	81,9	1,1	IRFAN e SYED, 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	64,0	1,5	FADEL et al., 2014
<i>Aspergillus flavus</i>	35 – 70	48,9	2,1	MILALA et al., 2013
<i>Alternaria alternate</i>	40 – 90	78,8	1,3	DOLMA et al., 2014
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	35 – 80	84,7	1,4	KAMBLE e JADHAV, 2012
<i>Penicillium janthinellum</i>	20 – 80	87,0	1,5	ABIRAMI et al., 2011
Acetona (% v/v)				
<i>Chainia</i> sp.	80	87,7	3,8	VARMA et al., 1999
<i>Aspergillus niger</i>	75	-	1,3	BENEDETTI et al., 2013
<i>Chainia</i> sp.	66	93,5	8,7	VARMA et al., 1999
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	86,2	2,7	FADEL et al., 2014
Etanol (% v/v)				
<i>Trichoderma harzianum</i>	90	98,0	-	MARIÑO et al., 2015
<i>Aspergillus fumigatus</i>	80	23,0	-	FADEL et al., 2014
	40	68,6	1,3	
<i>Chainia</i> sp.	80	99,0	16,0	VARMA et al., 1999
<i>Trichodesma harzianum</i>	40	7,9	-	FADEL, 2001
<i>Penicillium janthinellum</i>	40 – 70	74,0	-	CORTEZ e PESSOA JR, 1999
	40 – 80	100,0		CORTEZ et al., 1998

*Concentração percentual (v/v) relativa à solução saturada de sulfato de amônio utilizada. X_R, atividade xilanásica recuperada; F_p, fator de purificação.

também foi utilizada com o sulfato de amônio como agente precipitante. Nesse caso, o melhor resultado foi 87% de recuperação apresentado por Abirami et al. (2011).

Os resultados apresentados na Tabela 1.1 mostram uma faixa muito ampla de atividade xilanásica recuperada, que vai desde 7,9 a 100%, e fator de purificação de até 16,0. Essa variação se dá de acordo com o agente precipitante utilizado ou a concentração deste. O sulfato de amônio tem sido o agente precipitante utilizado com mais frequência na recuperação de xilanases tanto por precipitação direta quanto por precipitação com corte. No caso do etanol, a necessidade de concentrações elevadas do precipitante para a obtenção de resultados satisfatórios eleva o risco de desnaturação da proteína e acaba por resultar em baixas recuperações em alguns casos.

No entanto, o etanol é um dos mais importantes precipitantes industriais e sua utilização apresenta-se como uma das melhores técnicas no processo de precipitação, pois suas características permitem que sua aplicação seja estendida a diferentes proteínas (CUI et al., 2007; GULUNSKI et al., 2011). O etanol pode ser usado como agente precipitante em altas concentrações em processos cujo objetivo é a obtenção de concentrado proteico para utilização direta ou posterior purificação (FADEL, 2001) ou na precipitação em etapas, também conhecida como precipitação com corte, na qual, a primeira precipitação é realizada em baixa concentração de precipitante visando a precipitação e remoção de proteínas totais diferentes das de interesse. Em seguida a concentração do precipitante é elevada para a precipitação do produto de interesse, essa operação eleva a pureza do produto final (CORTEZ et al., 1998). Há ainda a precipitação fracionada que é o uso de sucessivos cortes a diferentes concentrações do precipitante da qual o exemplo mais conhecido é o processo Cohn (COHN et al., 1946) utilizado para a obtenção de frações de diferentes constituintes proteicos do sangue humano. Apesar de simples, desde a década de 1940 quando foi estabelecido, o processo Cohn tem sofrido várias modificações para melhorar o rendimento e a pureza do precipitado obtido (BUCHACHER e IBERER, 2006).

Estudos realizados até hoje raramente utilizam curvas de solubilidade para caracterizar precipitação de proteínas, além disso, não existe um parâmetro paralelo à solubilidade que leve em consideração a atividade enzimática possível de ser recuperada. Recentemente, Pinheiro et al. (2015) lançaram o conceito de solutividade, o qual pretende agregar em um parâmetro tanto a medida de solubilidade proteica quanto a atividade enzimática recuperável. Segundo Pinheiro et

al (2015), a solutividade é a atividade enzimática inicial do fermentado que não é detectada no precipitado, seja por desnaturação, desativação ou devido à solubilidade da enzima.

Uma outra estratégia para aumentar a eficiência no processo de precipitação é o uso de sementes (cristais adicionados ao meio com o objetivo de eliminar o tempo de nucleação, induzir a formação e a tendência de crescimento dos cristais de biomoléculas em solução) técnica muito utilizada na cristalização tanto de moléculas simples como de proteínas (D'ARCY et al., 2007; ALLAHYAROV et al., 2015). Porém, até agora ainda não se encontrou na literatura relatos de utilização de sementes de forma análoga para a precipitação de proteínas em sistemas complexos (fermentados, extratos, etc).

1.1. Colocação do problema

Enzimas com atividade xilanolítica são cada vez mais estudadas e utilizadas em processos industriais devido à sua versatilidade com destaque na bioconversão da biomassa lignocelulósica em combustível e outros produtos. A variedade de microrganismos capazes de produzi-las, aliada à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a sua produção são alguns dos atrativos para que a sua aplicação seja ampliada. Porém, para que isso seja possível, é necessário se entender como melhor recuperar essas enzimas dos complexos enzimáticos produzidos de modo a manter o requerimento de alta atividade a um baixo custo.

Estudos de precipitação de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por diferentes microrganismos em FES ou FS têm revelado diferenças quantitativas (GAWANDE e KAMAT, 1999; NAIR et al., 2008; ELISASHVILI et al., 2008) e qualitativas (ESTEBAN et al., 1982; SHAO et al., 1995; INAGAKI et al., 1998) significativas entre os produtos obtidos na fase sólida. Tais diferenças podem estar relacionadas às características das enzimas presentes e suas concentrações em cada um dos complexos, assim como os efeitos relacionados ao agente precipitante.

No caso de precipitação de xilanases com etanol, os trabalhos da literatura apresentam resultados variados para complexos produzidos por diferentes microrganismos, sendo que, na maioria das vezes, os melhores resultados de recuperação de atividade enzimática foram obtidos

quando altas concentrações de etanol iguais ou maiores de 80% v/v foram utilizadas (MARIÑO et al., 2015; VARMA et al., 1999; FADEL, 2001).

Considerando a importância das xilanases para a indústria, inclusive na hidrólise enzimática do processo de produção de etanol de segunda geração, o potencial do fungo *A. niger* para a produção destas, a praticidade da precipitação como operação unitária e o baixo custo do etanol como agente precipitante é necessário agregar conhecimento acerca das variáveis envolvidas no processo de precipitação de xilanases dos complexos enzimáticos produzidos por esta espécie. Além disso, existe a possibilidade de se estudar a precipitação de xilanases utilizando o conceito de solutividade, assim como necessidade de estudos com a utilização de semente na precipitação de xilanases a partir do complexo enzimático, uma vez que não há nada descrito na literatura a respeito deste tema.

A utilização desse conjunto de informações poderá abrir caminho para processos de recuperação mais eficientes dessas enzimas com a possibilidade de armazenamento por um período mais longo, resultando em aumento de eficiência e redução de custos tanto para uso em pesquisa como para as indústrias que as utilizam em seus processos de produção.

1.2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo estudar de forma sistemática e comparativa, a precipitação de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e FS utilizando etanol como agente precipitante, com o enfoque do conceito de solutividade e do uso da técnica de semeadura em precipitação, buscando a maior recuperação de xilanases ativas presentes nestes complexos.

1.3. Plano e etapas de trabalho desenvolvido

O plano de trabalho com as etapas desenvolvidas está representado na Figura 1.1 e as atividades referentes a estas etapas do trabalho são apresentadas de forma detalhada a seguir.

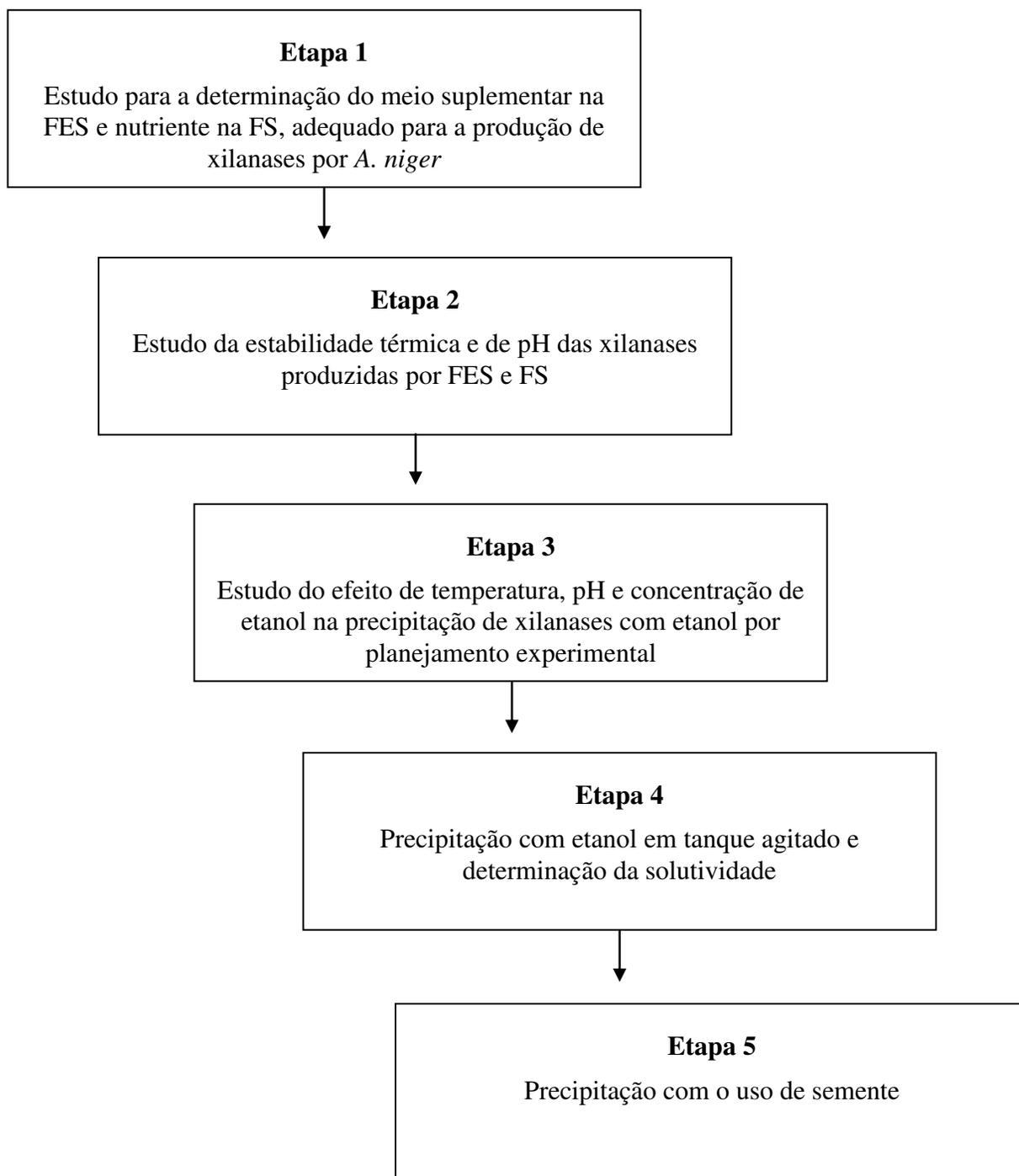


Figura 1.1: Diagrama esquemático das etapas do trabalho.

A **Etapa 1** constou das seguintes atividades:

- a) Reativação, manutenção e preparação de inóculo do fungo *A. niger*;
- b) Produção de complexos enzimáticos utilizando farelo de trigo como substrato sólido e meio Mandels (Mandels e Weber, 1969) ou solução de sulfato de amônio como meio de suplementação na FES e meio nutriente na FS;
- c) Caracterização enzimática dos complexos produzidos em termos de atividades enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase; concentração de proteínas; hidrólise de bagaço de cana *in natura* e perfil proteico dos complexos (SDS-PAGE), para a seleção do meio de suplementação adequado, visando a maior produção de enzimas nos dois sistemas de cultivo.

Na **Etapa 2** foram realizados ensaios para a definição das faixas adequadas (em termos da manutenção da atividade enzimática) de temperatura e de pH dos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e FS para a sequência dos estudos. Estas faixas foram definidas através das análises da estabilidade dos complexos em diferentes valores de temperatura (15,0 a 45,0 °C) e pH (3,0 a 8,0) em função do tempo de incubação, em termos da atividade enzimática de xilanase e concentração de proteínas totais.

Na **etapa 3** os complexos enzimáticos obtidos por FES e FS foram submetidos a ensaios de precipitação para a seleção de variáveis e estudo dos efeitos dessas variáveis sobre a precipitação de xilanas e proteínas totais dos complexos. A sequência desses estudos constou de:

- a) Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos pela adição de etanol para a verificação da concentração mínima do precipitante a ser utilizado nos experimentos de precipitação;
- b) Planejamento experimental fatorial 2^3 para as precipitações com etanol para a verificação entre as variáveis pH, temperatura e concentração de etanol daquelas que afetam a recuperação de xilanase (e sua pureza) na fase precipitado, isoladamente e em associação entre si, visando otimização em etapa posterior;

- c) Cinética preliminar de precipitação para a determinação do tempo de precipitação (período após se estabelecer no sistema as condições de precipitação) para os estudos planejados via planejamento experimental nas condições de ponto central (30,0 °C, pH 5,50 e etanol 80% v/v);
- d) Precipitação dos complexos enzimáticos com base no planejamento experimental fatorial 2^3 e na cinética preliminar de precipitação;
- e) Precipitação dos complexos enzimáticos segundo o planejamento experimental composto central 2^2 , com a temperatura fixa em 15,0 °C, utilizando como variáveis apenas o pH e a concentração de etanol;
- f) Estudo cinético de precipitação visando a determinação do perfil cinético de precipitação (período após se estabelecer no sistema as condições de precipitação) dos complexos enzimáticos com etanol.

A **Etapa 4** referiu-se ao estudo de precipitação em tanque agitado no qual realizou-se:

- a) Determinação do ponto de turvação do fermentado durante a adição de etanol para a determinação do limite mínimo da concentração do precipitante a ser utilizado nos experimentos de precipitação;
- b) Determinação da solubilidade de proteínas e da solutividade de atividade xilanásica em função da concentração de etanol, parâmetros fundamentais para se projetar etapas de precipitação;
- c) Precipitação em duas etapas (corte) visando aumento de pureza;

Na **Etapa 5** foram realizados os estudos de precipitação com o uso de semente, visando eliminação do tempo de nucleação e aumento de pureza, este constituiu-se de:

- a) Preparação da semente;
- b) Precipitação com a utilização de semente e seus respectivos controles.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais de hemicelulose, xilana e xilanase

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante na natureza, constituindo de 20 a 50% da biomassa lignocelulósica (LAUREANO-PEREZ et al., 2005) e refere-se a um grupo de homo e heteropolímeros de estrutura complexa formada por cadeias de xilana, xiloglucana, glucomanana, galactoglucomanana, arabinogalactana ou outros heteropolímeros (FENGEL e WEGENER, 1984; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Diferente da celulose, a hemicelulose não contém em sua estrutura regiões cristalinas. Essa estrutura amorfa a torna mais suscetível à hidrólise química sob condições relativamente brandas (SUN e CHENG, 2005). Esse polímero funciona como uma ligação entre a lignina e as fibras de celulose e sua presença confere mais rigidez a toda rede de celulose-hemicelulose-lignina (LAUREANO-PEREZ et al., 2005).

A degradação enzimática da hemicelulose é, em alguns aspectos, parecida com a da celulose, porém, devido à variedade de açúcares na sua composição, a degradação completa requer a atuação de um número maior de enzimas (MALHERBE e CLOETE, 2002).

O teor e a proporção dos diferentes componentes que formam a hemicelulose variam bastante dependendo da fonte vegetal (JARDINE et al., 2009). O material hemicelulósico constitui cerca de 30-35% das madeiras duras (angiospermas), 15-30% das gramíneas e 7-12% das madeiras macias (gimnospermas). O componente dominante da hemicelulose da biomassa agrícola, como gramíneas e palha, é a xilana, na madeira macia é a glucomanana, enquanto que o principal componente da hemicelulose de madeira dura é a glucuronoxilana (DHIMAN et al., 2008; JEFFRIES, 1994).

2.1.1. Xilana: características, aplicação e degradação

A xilana, principal componente da hemicelulose, é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo β -

1,4. Na natureza a cadeia principal pode ter a adição de unidades de ramificações como 4-O-metil- α -D-glucuronopiranosil, acetil, α -L-arabinofuranosil (Figura 2.1), em várias proporções dependendo da fonte (POLIZELI et al., 2005; DHIMAN et al., 2008; MOTTA et al., 2013). Este polímero forma uma interface entre a lignina e outros polissacarídeos, estando presente principalmente na parede celular secundária e ligada covalentemente com resíduos fenólicos da lignina e outros polissacarídeos como pectinas e glicanos (DHIMAN et al., 2008).

A xilana apresenta grande diversidade em termos de molecularidade e grau de polimerização podendo também ser classificada com base nos substituintes ligados à cadeia principal (Tabela 2.1) (MELO, 2010).

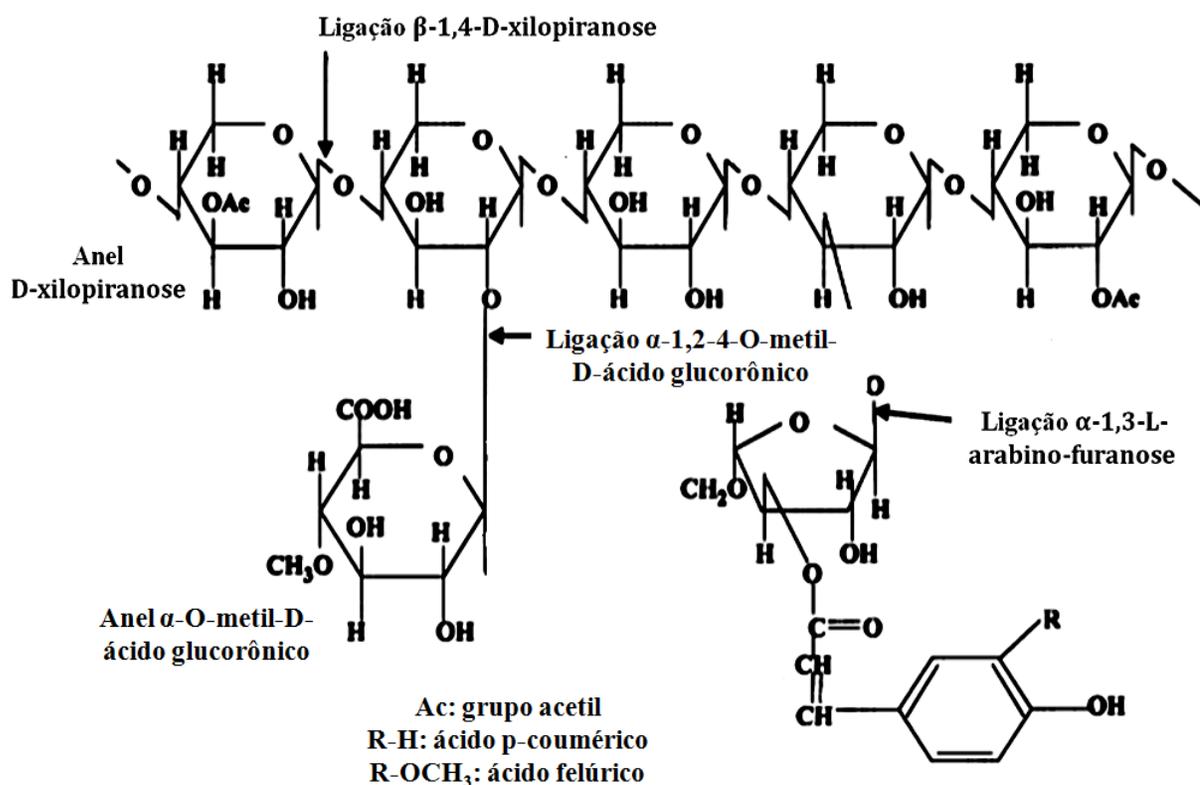


Figura 2.1: Representação esquemática de uma molécula de xilana mostrando diferentes grupos substituintes (adaptada de BEG et al., 2001).

Tabela 2.1: Estrutura dos diferentes tipos de xilana.

Polissacarídeo	Origem biológica	Biomassa seca (%)	Representação esquemática
Glucuronoxilana	Madeira dura	15-30	
Arabinoglucuronoxilana	Gramíneas, cereais e madeira macia	05-10	
Arabinoxilana	Cereais	0,15-30	
Glucuronoarabinoxilana	Gramíneas e cereais	15-30	
Homoxilana linear	Algas	-	

, β -D-xilopiranosil; , 4-O-metilglucorônico; , grupo acetil; , β -L-arabinofuranosil; , feruloil. Adaptada de GÍRIO et al., 2010.

As cadeias laterais da molécula determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula de xilana com outros componentes hemicelulósicos e, portanto, influenciam o modo e a extensão da clivagem enzimática (MOTTA et al., 2013).

2.1.2. Xilanases: características, aplicação e função

As xilanases são enzimas extracelulares que degradam a xilana contida na hemicelulose, material da parede celular vegetal. Sua ação na despolimerização resulta na conversão de substâncias poliméricas em xilooligossacarídeos e xilose (AHMAD et al., 2013).

Vários microrganismos, incluindo fungos filamentosos, bactérias, e leveduras têm demonstrado diferentes potenciais para a síntese de enzimas com atividade xilanásica. Dentre eles, os fungos são a fonte mais frequente de hemicelulases como xilanases e glucanases (BAKALOVA et al., 1995; AHMAD et al., 2013). Na alimentação humana e animal, enzimas xilanolíticas liberam nutrientes pela hidrólise das fibras de hemicelulose não degradáveis tornando estes nutrientes disponíveis (AHMAD et al., 2013). Na indústria papelreira, as xilanases são utilizadas para a remoção de complexos lignina-carboidrato gerados no processo kraft que atuam como barreiras físicas para a entrada dos produtos químicos de branqueamento, sendo que, o pré-requisito para a aplicação de xilanases na indústria do papel é que o conteúdo enzimático esteja isento de atividade de celulase (CARMONA et al., 1998).

Devido à sua utilização na fermentação, para aplicação na produção de pão e na preparação de ração animal, dentre outros, nas últimas décadas, o interesse sobre a xilana e complexos enzimáticos xilanolíticos cresceu bastante (AHMAD et al., 2013). Em razão da heterogeneidade e complexidade química da xilana, a sua degradação completa requer a ação de um complexo de várias enzimas hidrolíticas com diversas especificidades e modos de ação (BEG et al., 2001). Desta forma, o sistema enzimático que realiza a hidrólise da xilana é normalmente composto por um conjunto de enzimas hidrolíticas que atuam de forma sinérgica (JUTURU e WU, 2012). As enzimas que atuam sobre a cadeia principal são as exohidrolases que clivam ligações glicosídicas terminais removendo unidades de monossacarídeos de terminais não redutores e endohidrolases que realizam a clivagem aleatoriamente ou em ligações glicosídicas específicas dependendo do tipo de enzima (POLIZELI, 2009).

Na Figura 2.2, estão representados os pontos de ação de várias enzimas que participam de maneira sinérgica na degradação total da xilana. Segundo Polizeli (2009), a α -glucuronidase remove o ácido 4-O-metil glucurônico a partir da cadeia principal da xilana enquanto a feruloil ou p -coumaroil esterase cliva as ligações éster entre arabinose e ácido felúrico ou arabinose e ácido p -cumárico. A α -arabinofuranosidase remove os resíduos de L-arabinose substituídos nas

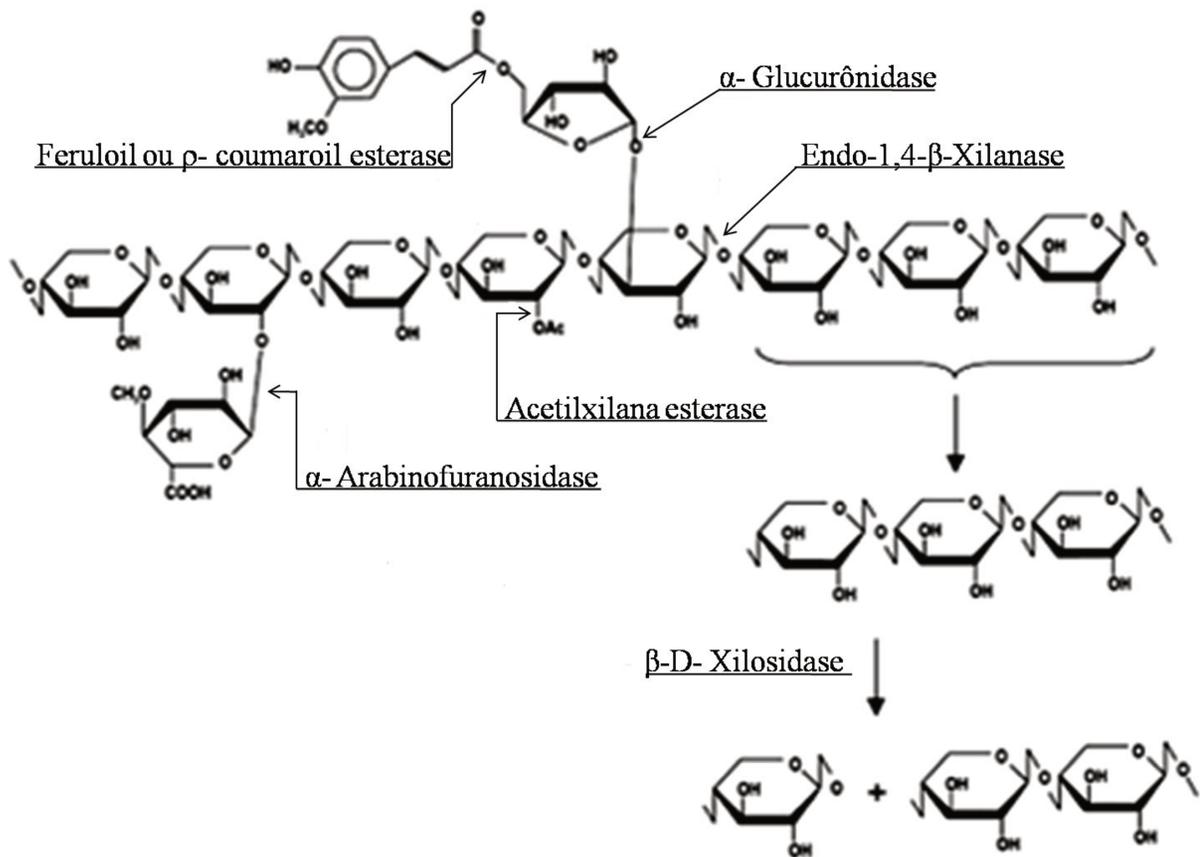


Figura 2.2: Representação esquemática da atuação das enzimas do sistema xilanolítico sobre uma molécula de xilana. Ac, grupo acetil. Adaptado de POLIZELI (2009).

posições 2 e 3 da xilose e a acetil xilana esterase remove os grupos O-acetil de posições 2 ou 3 nos resíduos de xilose da acetil xilana produzindo ácido acético e uma xilana menos acetilada, proporcionando maior susceptibilidade à hidrólise pela endoxilanase. A endo-1,4-β-xilanase cliva ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana produzindo xilooligosacarídeos de comprimento variável, provocando a redução no grau de polimerização do substrato. Já a β-xilosidase hidroliza moléculas pequenas, tais como mono, di e trissacarídeos de β-D-xilopiranosil que são oligômeros curtos de xilose liberados pela endo-1,4-β-xilanase. Porém, o melhor substrato para β-xilosidase é a xilobiose cujo produto final são os monômeros de xilose.

De uma forma geral, as xilanases de origem microbiana possuem composição proteica simples e ampla faixa de massa molecular (entre 8 e 180 kDa), sendo ativas na faixa de pH 4,5 a 6,5 e temperatura entre 40 e 60 °C (Tabela 2.2) (PALMA, 2003; BEG et al., 2001).

Tabela 2.2: Características de xilanases de diferentes microrganismos.

Microrganismo	Massa molecular (kDa)	Valores ótimos		pI	Referência
		pH	Temperatura (°C)		
Bactéria					
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41,0	5,0	65,0	7,3	INAGAKI et al., 1998
<i>Bacillus circulans</i>	15,0	5,5-7,0	5,0	9,1	ESTEBAN et al., 1982
<i>Bacillus sp.</i>	32,0	5,5	50,0	7,9	BLANCO et al., 1995
<i>Staphilococcus sp.</i>	60,0	7,5-9,2	50,0		GUPTA et al., 2000
<i>Thermoanaero bacterium sp.</i>	24,0; 180,0	6,2	80,0	4,4	SHAO et al., 1995
<i>Thermotoga maritime</i>	40,0; 120,0	5,4; 6,2	92,0; 105,0	5,6	WINTERHALTER e LIEBEL, 1995
Levedura					
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25,0	4,4	54,0	9,4	LI et al., 1993
<i>Cryptococcus albidus</i>	48,0	5,0	25,0	-	MOROSOLI et al., 1986
Actinomiceto					
<i>Streptomyces sp.</i>	23,8; 40,5	6,0 - 7,0	55,0 - 60,0	4,8 - 8,3	ELEGIR et al., 1994
	20,0	4,5-5,5	60,0	7,8	KESKAR, 1992
<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	48,0	6,0	50,0	9,0	LOPEZ-FERNANDEZ et al., 1998
Fungo					
<i>Acrophialophora nainiana</i>	17,0	6,0	50,0	-	XIMENES et al., 1999
<i>Aspergillus niger</i>	14,0	5,5	45,0	9,0	FREDERICK et al., 1985
<i>Aspergillus fischeri</i>	31,0	6,0	60,0	-	RAJ e CHANDRA, 1996
<i>Aspergillus sojae</i>	32,7; 35,5	5,0; 5,5	60,0; 50,0	3,5-3,75	KIMURA et al., 1995
<i>Aspergillus awamori</i>	18,0; 52,0	5,5	60,0	-	SILVA et al., 1999
<i>Aspergillus fumigatus</i>	39,0; 23,0;	4,0 - 5,0	50,0 - 70,0	-	KITAMOTO et al., 1999
<i>Geotrichum candidum</i>	35,0	5,5	55,0	-	RODIONOVA et al., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	20,8; 23,5	8,0	40,0	-	LIN et al., 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	4,0	50,0	5,2	TENKANEN et al., 1992
<i>Trichoderma reesei</i>	25,5	5,0-7,3	50,0 - 60,0	5,9 - 8,6	

Fonte: Adaptado de BEG et al., 2001.

Os valores de massa molecular de xilanases produzidas por fungos variaram entre 14 kDa para xilanases de *A. niger* (FREDERICK et al., 1985) e 52 kDa para aquelas produzidas por *A. awamori* (SILVA et al., 1999), enquanto que os valores mais elevados de massa molecular foram encontrados em xilanases produzidas por bactérias, chegando a 180 kDa (SHAO et al., 1995). Quanto ao ponto isoelétrico (pI) das xilanases, estes também abrangem uma faixa ampla com os valores variando entre 3,5 a 9,4 (KIMURA et al., 1995; LI et al., 1993).

A maioria das enzimas com atividade xilanolítica utilizadas na indústria são produzidas por organismos mesófilos (crescimento ótimo em temperaturas entre 15 e 45 °C). No entanto, para ter um impacto significativo em escala industrial, enzimas (xilanolíticas ou não) devem apresentar estabilidade e eficiência sob várias condições de operação, inclusive naquelas onde há a necessidade de utilização de condições de pH e temperatura extremas (BEG et al., 2001; COLLINS et al., 2005). Muitas xilanases utilizadas na indústria são de mesófilos ou tem origem neutrofílica (pH próximo de 7,0).

Existem ainda enzimas produzidas por microrganismos que colonizaram ambientes considerados extremos, do ponto de vista antropocêntrico, e que produzem enzimas adaptadas a estes ambientes. Estas xilanases são ativas em baixas temperaturas como 5 °C (INAGAKI et al., 1998) ou temperaturas relativamente elevadas como 105 °C (WINTERHALTER e LIEBEL, 1995) e valores de pH que podem variar de 2,0 a 11,0 (COLLINS et al., 2005).

Xilanases produzidas por vários microrganismos termófilos (crescimento ótimo entre 50 e 80 °C) e hipertermofílicos (crescimento ótimo acima de 80 °C) podem ser aplicadas em sistemas nos quais o resfriamento seria economicamente inviável ou há a necessidade de altas temperaturas para aumentar a biodisponibilidade, solubilidade dos substratos, reduzir a viscosidade ou para reduzir o risco de contaminação (KANWAR e DEVI, 2013; COLLINS et al., 2005).

Por outro lado, xilanases de organismos psicrófilos (crescimento ótimo baixo de 15 °C) são indicadas para processos no qual o aquecimento é prejudicial ou temperaturas baixas são necessárias para evitar a alteração na qualidade do produto (sabor, cor, etc.), desenvolvimento microbiano, fermentação ou evitar a desnaturação do produto. Xilanases adaptadas ao frio oferecem vantagens sobre as termofílicas em processos na indústria alimentícia; por exemplo, na preparação e impermeabilização da massa de panificação (COLLINS et al., 2005).

Enzimas acidofílicas e alcalifílicas, obviamente, são indicadas para processos em que são necessárias condições extremas de pH ou onde o ajuste do pH para 7,0 ou valores próximos da neutralidade não é possível ou economicamente viável. Xilanases termo-alcalifílicas ou mesmo termo-acidofílicas podem também ser utilizadas em processos de bioconversão nos quais vários tipos de pré-tratamentos, incluindo o pré-tratamento alcalino, ácido ou hidrotérmico, podem ser usados antes ou simultâneo ao processo enzimático. Estas informações demonstram que as enzimas que combinam um maior número de características extremofílicas tendem a ter uma maior aplicação na indústria (MIELENZ, 2001; KANWAR e DEVI, 2013).

Quanto à estabilidade térmica e de pH, em termos da manutenção da atividade enzimática a diferentes valores de temperatura e de pH, estudos com xilanases fúngicas têm apresentado resultados variados. Alguns desses resultados são apresentados nas Tabelas 2.3 e 2.4.

Tabela 2.3: Estudos de estabilidade térmica de xilanases.

Fungo	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	2,0	45,0	GUIMARÃES et al., 2013
<i>Aspergillus phoenicis</i>	0,5	40,0	CHIPETA et al., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	3,0	30,0 – 45,0	BAKRI et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i>	1,0	45,0	BETINI et al., 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	1,0	50,0	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1,0	50,0	

Guimarães et al. (2013) relataram a estabilidade total a 45,0 °C por 2 h de xilanases produzidas por *A. niger* em FS. Xilanases de *A. phoenicis* também mantiveram 100% da atividade a 40,0 °C por 30 min (CHIPETA et al., 2005). No trabalho de Bakri et al. (2010) a cepa FSS129 de *A. terreus* produziu xilanases que foram totalmente estáveis na faixa de 30,0 – 45,0 °C por até 3 h. Enzimas com atividade xilanolítica produzidas em FES por *A. niger* foram totalmente estáveis à 45 °C por 1 h, enquanto as xilanases de *A. niveus* e *A. ochraceus* mantiveram-se totalmente estáveis em até 50,0 °C por 1 h (BETINI et al., 2009).

Tabela 2.4: Estudos de estabilidade de xilanases a diferentes valores de pH.

Fungo	Tempo (h)	pH	Atividade inicial mantida (%)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	1,0	3,0 – 8,0	95	GUIMARÃES et al., 2013
<i>Aspergillus terricola</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	1,0	2,5 – 8,0	70	MICHELIN et al., 2010
<i>Aspergillus niger</i>	1,0	2,0 – 7,0	>75	BETINI et al., 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	1,0	3,5 – 7,0	>70	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1,0	3,0 – 7,0		

No trabalho de Guimarães et al. (2013), xilanases de *A. niger* incubadas por 1 h mantiveram mais de 95% da atividade original na faixa de pH 3,0 – 8,0. Xilanases de *A. terricola* e *A. ochraceus* mantiveram estabilidade superior a 70% por 1 h na faixa de pH de 2,5 a 8,0 (MICHELIN et al., 2010). Nos estudos de estabilidade de pH realizados por Betini et al. (2009), xilanases de *A. niger* mantiveram-se relativamente estáveis na faixa de pH de 2,0 – 7,0, mantendo mais de 75% da atividade, enquanto as xilanases de *A. niveus* e *A. ochraceus* foram estáveis entre pH 3,5 – 7,0 e 3,0 – 7,0, respectivamente, mantendo mais de 70% de atividade. Nestes estudos, o tempo de incubação foi de 1 h.

Segundo Fang et al. (2007) e Kulkarni et al. (1999), a maioria das xilanases de origem fúngica são estáveis em um amplo intervalo de pH. Esta característica pode ser atribuída à associação de outras proteínas extracelulares às xilanases que as protegem contra a desnaturação pelo efeito do pH.

2.2. Técnicas de cultivo para produção de complexos enzimáticos

A partir da segunda metade do século XX viu-se um grande avanço no conhecimento sobre o uso de microrganismos e seus produtos metabólicos (enzimas), incluindo suas possíveis aplicações industriais (BEG et al., 2001). Entre as técnicas utilizadas para o processo de produção industrial de enzimas de origem microbianas destacam-se a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS) (PANAGIOTOU et al., 2003).

2.2.1. Fermentação em estado sólido (FES): características gerais

A técnica de fermentação em estado sólido (FES) é caracterizada principalmente pela ausência de água livre no meio. Nesta técnica o substrato deve possuir a umidade suficiente apenas para que o microrganismo cresça e se desenvolva metabolicamente (PANDEY e RADHAKRISHNAN, 1992). Segundo Zúñiga (2010), para serem utilizados na FES as partículas dos substratos devem possuir porosidade e tamanho adequados, com grande área superficial por unidade de volume, características que facilitarão a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato, condições que podem ser atingidas por tratamento e acondicionamento prévios à fermentação.

A FES tem um potencial econômico considerável na produção de insumos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola (PANDEY e RADHAKRISHNAN, 1992). Além disso, essa técnica de produção de enzimas é de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (CASTILHO et al., 2000). Vantagens como a economia de espaço, maior rendimento de produção e baixo nível de contaminação, decorrente da falta de água livre no sistema, fazem da FES uma técnica atrativa para a produção de enzimas fúngicas (GAWANDE e KAMAT, 1999). Por outro lado, a menor gama de produtos obtidos e de microrganismos aptos a crescer nessas condições, as dificuldades no controle do processo e na adição de soluções desejadas, além de menor disponibilidade de informações na literatura no que tange a fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento e de produção enzimática são algumas das limitações dessa técnica (CASTRO e PEREIRA Jr., 2010). Apesar destas desvantagens, devido ao potencial de utilização da FES em diversos setores da indústria pelo conjunto de vantagens que esta apresenta, torna-se de interesse econômico o desenvolvimento de novos processos que utilizem este sistema, assim como a otimização dos processos já existentes (MACIEL, 2006).

A FES é muito utilizada para o cultivo de fungos filamentosos, uma vez que estes crescem na superfície da partícula utilizando o oxigênio presente entre elas e sua estrutura filamentosa permite a sua penetração, através de suas hifas, no interior do substrato sólido com melhor aproveitamento dos nutrientes nele contidos. Nesse caso, a interação entre o microrganismo e o substrato possibilita a decomposição de substratos sólidos. O processo de

crescimento de fungos filamentosos em substrato sólido que ocorre na FES requer menos energia e produz menos resíduo líquido do que na FS, além de agregar valor aos resíduos sólidos, principalmente os agrícolas, evitando problemas ambientais causados pelo acúmulo dos mesmos (PANDEY, 2003).

2.2.2. Fermentação submersa (FS): características gerais

A técnica de fermentação submersa é caracterizada pela presença de água em excesso no meio, tornando-o relativamente homogêneo. A FS oferece algumas vantagens sobre a FES, dentre as quais se destacam a facilidade no controle de parâmetros como pH e O₂ dissolvido, além de troca de calor do sistema, reduzindo a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termoestabilidade, e permite o controle da fonte de carbono e retirada do produto do meio, evitando a repressão catabólica (GONZÁLEZ et al., 2002).

No entanto, há uma maior probabilidade de contaminação pela presença de maior quantidade de água do que na FES. Outra limitação desta técnica é o fato de os produtos estarem diluídos, sendo necessária uma etapa de concentração na purificação e os complexos enzimáticos podem apresentar baixa estabilidade (MATSUMOTO et al., 2004). Além disso, a FS leva à geração de grandes volumes de resíduo líquido, requer uma maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produto do meio, quando comparada à FES. Há ainda a possibilidade de problemas reológicos no sistema (aumento da viscosidade), quando operado com elevadas concentrações de substrato (ELLAIAH et al., 2002).

Uma vez que a diferença entre a FES e a FS está na presença ou ausência de água livre no meio reacional é necessário observar que em um bioprocessamento a água possui muitas funções, tais como a difusão de nutrientes no meio e a absorção destes pelos microrganismos, a remoção de metabólitos, a manutenção da função pela estabilidade da estrutura de proteínas, nucleotídeos e carboidratos, manutenção da estabilidade da estrutura lamelar com a conservação da permeabilidade da membrana plasmática (RAIMBAULT, 1998; GERVAIS e MOLIN, 2003). Segundo Gervais e Molin (2003), para o caso específico do cultivo de fungos filamentosos, a baixa quantidade de água pode causar a desnaturação de enzimas-chaves do metabolismo das células levando ao desequilíbrio nas vias metabólicas, afetar os processos de germinação,

esporulação e formação de metabólitos, reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular.

2.2.3. Produção de xilanases por FES e FS

Além das vantagens e desvantagens das duas técnicas de cultivo para a produção de complexos enzimáticos, muitos autores têm relatado diferenças significativas nas características físico-químicas e nas atividades enzimáticas entre os complexos. Em outros trabalhos estes também têm apresentado diferenças de rendimento na produção de enzimas. Os resultados de alguns desses trabalhos são resumidos na Tabela 2.5.

O trabalho de Gawande e Kamat (1999), que utilizou diferentes substratos sólidos e temperatura de 35 °C para a produção de xilanases por *Aspergillus terreus*, apresentou maior rendimento e atividade xilanásica em FS do que em FES, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando o farelo de trigo foi utilizado como substrato. Neste mesmo trabalho, resultado parecido foi obtido quando o microrganismo utilizado foi o *Aspergillus niger*, exceto quando o bagaço de cana foi utilizado como substrato, no qual o rendimento em FES foi superior. Nair et al. (2008), utilizando farelo de trigo e temperatura de 30 °C na produção de xilanases por diferentes espécies de *Aspergillus*, registraram a superioridade da FES na produção desta enzima. No trabalho de Elisashvili et al. (2008) a FES utilizando palha de trigo e a FS utilizando casca de tangerina resultaram no mesmo rendimento de atividade xilanásica nos fermentados produzidos pelo fungo basidiomiceto *Lentinus edodes*. No entanto, quando o microrganismo utilizado foi o *Pleurotus ostreatus* a FES apresentou o melhor resultado. Em todos os resultados apresentados as maiores atividades enzimáticas específicas foram registradas para a FS, estes experimentos foram conduzidos a 30 °C.

De maneira geral, os complexos enzimáticos produzidos por FES e FS apresentam diferenças quantitativas, ou seja, complexos produzidos por microrganismos podem ter maiores rendimentos de xilanases quando produzidos em FES enquanto outros terão melhores rendimentos apenas quando produzidos em FS. Esse comportamento reforça a ideia da grande influência do nível de água no meio.

Tabela 2.5: Estudos de obtenção de xilanases por FES e FS.

Fonte	FES				FS				Referência
	Substrato	T (°C)	A _x	A _e (UI.mg ⁻¹)	Substrato	T (°C)	A _x	A _e (UI.mg ⁻¹)	
<i>Aspergillus terreus</i>	Farelo de trigo	35	21,2 UI.mL ⁻¹	11,1	Farelo de trigo	35	38,5 UI.mL ⁻¹	27,5	GAWANDE e KAMAT, 1999
	Bagaço de cana		3,5 UI.mL ⁻¹	3,4	Bagaço de cana		17,2 UI.mL ⁻¹	13,2	
	Casca de soja		6,2 UI.mL ⁻¹	3,6	Casca de soja		12,5 UI.mL ⁻¹	8,3	
	Palha de arroz		10,5 UI.mL ⁻¹	7,0	Palha de arroz		23,7 UI.mL ⁻¹	18,2	
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	35	26,7 UI.mL ⁻¹	14,8	Farelo de trigo	35	35,5 UI.mL ⁻¹	53,8	NAIR et al., 2008
	Bagaço de cana		18,0 UI.mL ⁻¹	10,0	Bagaço de cana		12,5 UI.mL ⁻¹	10,4	
	Casca de soja		8,7 UI.mL ⁻¹	4,8	Casca de soja		24,8 UI.mL ⁻¹	19,1	
	Palha de arroz		11,8 UI.mL ⁻¹	9,8	Palha de arroz		16,7 UI.mL ⁻¹	12,0	
<i>Aspergillus flavus</i>			738 UI.g ⁻¹	41			31 UI.mL ⁻¹	1823	
			608 UI.g ⁻¹	13			38 UI.mL ⁻¹	156	
			489 UI.g ⁻¹	49			10 UI.mL ⁻¹	400	
			543 UI.g ⁻¹	21			40 UI.mL ⁻¹	607	
<i>Lentinus edodes</i>	Palha de trigo	27	22,9 UI.mL ⁻¹		Casca de tangerina	27	22,8 UI.mL ⁻¹		ELISASHVILI et al., 2008
<i>Pleurotus ostreatus</i>			61,3 UI.mL ⁻¹				32,4 UI.mL ⁻¹		

A_x, atividade xilanásica, A_e, atividade enzimática específica por massa de proteína.

2.2.4. A espécie *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um fungo filamentosos que cresce aerobicamente em matéria orgânica. Na natureza, é encontrado no solo, lixo, adubo e material vegetal em decomposição. Pode crescer na faixa de temperatura de 6 a 47 °C, com uma temperatura ótima relativamente elevada, de 35 a 37 °C. O limite de atividade de água para o seu crescimento é de 0,88, considerada alta quando comparada com outras espécies de *Aspergillus*. Esta espécie também é capaz de crescer em uma faixa de pH extremamente ampla, de 1,4 a 9,8. Tais habilidades somadas à produção abundante de conídios, os quais são disseminados pelo ar, garantem a ampla distribuição geográfica da espécie, com maior frequência em lugares quentes e úmidos (SCHUSTER et al., 2002).

A espécie *A. niger* tem sido objeto de pesquisa e de uso industrial há várias décadas. A pesquisa adquiriu importância prática quando a sua capacidade em produzir ácido cítrico foi explorada industrialmente em 1919 (SCHUSTER et al., 2002). Essa espécie fúngica ganhou maior atenção devido à sua grande capacidade de secretar enzimas celulolíticas (LIU et al., 2011). *A. niger* tem sido bastante utilizado na produção de enzimas como a glicose oxidase (MIRÓN et al., 2008), lacase (TÉLLEZ et al., 2006), pectinase (SOUZA, 2008), lactase, invertase, celulase (CARDOSO et al., 2008), amilase (GUPTA, 2008), protease (COELHO, 2001), endoglucanase (CUNHA et al., 2012), poligalacturonase (SANTOS et al., 2008), xilanase (FARINAS et al., 2011), fitase (CASEY e WALSH, 2003) e lipase (KAMINI et al., 1998).

Segundo Nasser et al. (2003), a baixa toxicidade fez do fungo *A. niger* uma das poucas espécies que receberam o status de GRAS (“generally regarded as safe”) conferido pela “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA. Isso faz com que as enzimas produzidas por essa espécie sejam aceitáveis para o uso na indústria de alimentos, razão pela qual é frequentemente utilizado para a produção de pectinases (MALVESSI e SILVEIRA, 2004; STRICKER et al., 2008).

Devido às características biológicas, a variedade de enzimas presentes nos seus complexos enzimáticos e as diversas aplicações de seus produtos enzimáticos, como na indústria de alimentos, papel-celulose e têxtil, *A. niger* tornou-se um dos principais fungos em uso na biotecnologia industrial, principalmente, para o estudo da hidrólise enzimática aplicada na etapa de sacarificação da obtenção de etanol de segunda geração, devido ao seu potencial na degradação de material lignocelulósico (ANDERSEN et al., 2011; FARINAS et al., 2011).

2.2.5. Xilanases produzidas por *Aspergillus niger*

Idealmente, para aplicações comerciais, xilanases devem ser produzidas rapidamente e em grande quantidade a partir de substratos simples e baratos (GAWANDE e KAMAT, 1999). O fungo *A. niger* é uma das fontes industriais que produz xilanases, livres ou não de celulases (BINOD et al., 2011). Em muitas aplicações a presença de celulases no complexo enzimático não afeta o processo ou produto e, em alguns casos, celulases têm um efeito sinérgico. No entanto, xilanases livres de celulases também têm suas aplicações e são utilizadas com sucesso no processo de branqueamento de celulose para produção de papel (GAWANDE e KAMAT, 1999).

Na busca de melhorar a eficiência, principalmente em processos industriais, xilanases de *A. niger* têm sido produzidas em diferentes sistemas. As variações nos parâmetros de produção das enzimas permite a obtenção destas com características adaptadas ao novo sistema no qual foram geradas. Essas novas características possibilitam a aplicação de xilanases de *A. niger* em um campo cada vez mais amplo da indústria (FADEL et al., 2014).

A Tabela 2.6 apresenta diferentes características de enzimas com atividade xilanásica produzidas por *A. niger* em diferentes estudos. Nestes estudos, *A. niger* produziu enzimas com atividade xilanásica com massas moleculares diferentes, sendo que a maioria apresentou massa molecular relativamente baixa, de 13 até 36 kDa (FREDERICK et al., 1985; CORAL et al., 2002). Entretanto, as β -xilosidases produzidas em FS, relatadas nos trabalhos de Rodionova et al. (1983) e Matsushita et al. (1985) apresentaram altas massas moleculares (122 e 123 kDa, respectivamente). Estes dados mostram que *A. niger* produz xilanases dos dois grandes grupos estruturais que, segundo Kirk e Jeffries (1996), é composto pela família F ou 10, que compreende as xilanases de massa molecular relativamente elevada, e a família G ou 11, que são xilanases de baixa massa molecular.

As enzimas com baixa massa molecular mostraram pH ótimo de atividade na faixa de 4,0 a 7,5 (GORBACHEVA e RODIONOVA, 1977; AHMAD et al., 2013; CORAL et al., 2002) e temperatura ótima de atividade entre 42 e 60 °C (FOURNIER et al., 1985; CUYVERS et al., 2011), enquanto que as proteínas de altas massas moleculares tiveram o pH ótimo de atividade nas regiões de pH ácido, entre 2,5 e 5,0. Quanto à temperatura de estabilidade, as enzimas produzidas por FS nos trabalhos de Uchida et al. (1992), Rodionova et al. (1983) e Matsushita et al. (1985) podem ser consideradas termoestáveis, com temperaturas ótimas elevadas chegando até

Tabela 2.6: Características de enzimas com atividade xilanolítica produzidas por *A. niger*.

Enzima	Massa molecular (kDa)	Valores ótimos		pI	Referência
		pH	Temperatura (°C)		
Xilanases	32,3	5,0	55,0 - 60,0	-	BENEDETTI et al., 2013
	30,0	7,5	60,0	-	AHMAD et al., 2013
	36,0	7,5	60,0	-	CORAL et al., 2002
Endo-xilanase	21,0	5,0	55,0	6,7	FREDERICK et al., 1981
1-4-β-D-xilana xilohidrolase (I)	13,0	6,0	45,0	8,6	FREDERICK et al., 1985
1-4-β-D-xilana xilohidrolase (II)	13,0	5,5	45,0	9,0	
Endo-xilanase (1,4-β-D-xilana xilanohidrolase)	14,0	4,9	45,0	4,5	SHEI et al., 1985
	28,0	5,0	42,0	3,65	FOURNIER et al., 1985
Acetil xilana esterase	30,5	5,5-6,0	50,0	3,0-3,2	KORMELINK et al., 1993
Endo-β-1,4-xilanase	23,0	5,5	50,0		LEVASSEUR, et al., 2005
Endo-xilanase	25,0	4,5	50,0 - 60,0	3,5	CUYVERS et al., 2011
	33,0	4,0	50,0	4,2	GORBACHEVA e RODIONOVA, 1977.
β-xilosidase		5,0	>75,0		UCHIDA et al., 1992
	122,0	3,8-4,0	70,0	4,9	RODIONOVA et al., 1983
	123,0	2,5 - 3,0	45,0	5,6	MATSUSHITA et al., 1985

acima de 75 °C. As enzimas do complexo xilanolítico de *A. niger* também mostraram uma faixa ampla de ponto isoelétrico (pI) que variou de 3,0 a 9,0, mostrando que esse fungo pode produzir xilanases com características acidofílicas, neutrofílicas e alcalifílicas (KORMELINK et al., 1993; FREDERICK et al., 1985).

De uma forma geral, a Tabela 2.6 mostra que, *A. niger* tem a capacidade de produzir e secretar enzimas com atividade xilanolítica que possuem características variadas tanto em massa molecular, temperatura ótima de atividade e ponto isoelétrico, possibilitando a sua utilização em diversas aplicações industriais.

2.3. Precipitação de biomoléculas

A precipitação de proteínas é a operação unitária na qual uma perturbação química ou física em uma solução proteica reduz a solubilidade da proteína presente e tem como consequência a formação de uma fase sólida. Subsequentemente, esta fase sólida pode ser recuperada por técnica de separação sólido-líquido adequada (ASENJO, 1990). A precipitação apresenta-se como um método tradicional muito utilizado, tanto em escala laboratorial quanto industrial, para o processo de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB). O processo de precipitação pode resultar na concentração e purificação de proteínas como no caso de misturas pouco complexas como enzimas extracelulares; porém, a concentração é mais efetivamente alcançada, razão pela qual essa técnica é usada principalmente nas fases iniciais de operações visando a redução do volume e, algumas vezes, aumentando a pureza da proteína antes de quaisquer passos de cromatografia (ASENJO, 1990). A facilidade de escalonamento, o uso de processo contínuo, a simplicidades de equipamentos e a variedade de precipitantes que podem ser utilizados são algumas das vantagens da aplicação da precipitação para concentração e purificação de bioprodutos (CORTEZ e PESSOA JR, 1999).

O precipitado de proteínas formado é comumente mais estável que o material em solução. Porém, durante a precipitação a proteína pode ter a sua estrutura tridimensional modificada pela utilização de um método agressivo. Uma vez que a função bioquímica da proteína é dependente da sua estrutura, esta modificação na estrutura tridimensional resulta em uma indesejável perda de atividade proteica, que pode ser extensa ou leve (SCOPES, 1987).

Um dos parâmetros a ser considerado no processo de precipitação é o ponto isoelétrico (pI) da proteína, uma vez que a solubilidade da proteína diminui quando o pH da solução aproxima-se do seu pI e, assim, proteínas podem ser precipitadas apenas pelo ajuste do pH da solução. No entanto, Janson e Lars (1989) relataram a desnaturação de algumas proteínas mesmo quando o pH da solução proteica estava ajustado no seu pI.

Assim como em solutos não biológicos, a solubilidade da proteína depende da temperatura: geralmente a diminuição da temperatura no sistema diminui a solubilidade da proteína; por outro lado, um aumento na temperatura eleva a solubilidade e pode ocasionar a desnaturação (GHOSH, 2006). Porém, não é raro o comportamento oposto, ou seja, a diminuição da solubilidade da proteína pelo aumento da temperatura. Este fenômeno é conhecido como solubilidade retrógrada (CHRISTOPHER et al., 1998). Assim, a determinação cuidadosa da curva de solubilidade em função da temperatura é uma etapa importante no desenvolvimento de processos de precipitação.

A diminuição da solubilidade e consequente precipitação de proteínas em solução é resultado de alteração da sua superfície ou de alteração das características do solvente, sendo que este último processo é o mais comumente utilizado. Além da facilidade de utilização, os métodos de precipitação de proteínas devem ser escolhidos de modo a proporcionarem um produto mais estável do que aquele encontrado na forma solúvel (ASENJO, 1990).

2.3.1. Métodos de precipitação de proteínas

Bell et al. (1983) apontam os seguintes métodos de precipitação de proteínas como sendo os mais importantes:

- 1) “Salting-out”: precipitação que ocorre pela adição de sal na solução proteica. Segundo Scopes (1987), o aumento da concentração de sal diminui a solubilidade pela neutralização das cargas superficiais da proteína e pela redução da camada de hidratação favorecendo as interações hidrofóbicas proteína-proteína, levando à agregação das moléculas de proteína e a formação do precipitado.

- 2) Precipitação isoelétrica: uma vez que proteínas são formadas por aminoácidos com cadeias laterais de caráter ácido ou básico elas podem apresentar carga global positiva ou negativa, dependendo do pH do meio. Com o ajuste do pH ao ponto isoelétrico (pI), onde a carga global média da proteína é nula, uma menor solubilidade é observada. Isso ocorre porque no pI a repulsão eletrostática entre as moléculas é minimizada, favorecendo também as interações hidrofóbicas e facilitando a atração entre as proteínas e consequentemente a precipitação.
- 3) Precipitação por polímeros não-iônicos: nesse método sugere-se que as proteínas são precipitadas por um mecanismo de exclusão destas do meio aquoso pela redução da quantidade de água disponível para a sua solvatação (BELL et al., 1983).
- 4) Precipitação por polieletrólitos: polieletrólitos de baixa massa molecular podem precipitar de proteínas pela neutralização de suas cargas (GREGORY, 1969). Por sua vez, na precipitação com polieletrólito de alta massa molecular ocorre a formação de pontes de polímeros entre as partículas com diversos pontos de ligação devido a interações eletrostáticas (RUEHRWEIN e WARD, 1952).
- 5) Precipitação por íons metálicos: íons metálicos polivalentes são utilizados em precipitação reversível de proteínas devido à sua capacidade de interagir com os locais específicos na molécula de proteína deslocando o seu pI. Os íons metálicos também podem levar à formação de ligações cruzadas com outras proteínas por serem multivalentes.
- 6) Precipitação por solventes orgânicos: a adição de solventes orgânicos miscíveis ao meio aquoso, tais como etanol ou acetona, provoca uma variedade de efeito que, combinados, resultam na formação de precipitado. Este método é, a seguir, discutido em maior detalhe.

2.3.2. Precipitação por solventes orgânicos

A adição de um solvente fracamente polar miscível em água, tais como etanol, metanol e acetona a uma solução proteica aquosa irá geralmente resultar em uma variedade de efeitos, que combinados, conduzem a formação de um precipitado. Desses efeitos o principal é a redução na atividade da água. Neste fenômeno (Figura 2.3), as moléculas de água da superfície da proteína

são substituídas por moléculas do solvente; como consequência, a camada de hidratação é reduzida, favorecendo as forças de atração eletrostática entre as moléculas de proteína (BELL et al., 1983; SCOPES, 1987).

Ao contrário do efeito “salting-out” dos sais, solventes orgânicos são desestabilizadores de proteínas. Desta forma, podem conduzir à desnaturação das proteínas quando utilizados em altas concentrações ou em altas temperaturas devido às suas favoráveis interações com grupos hidrofóbicos (INOUE e TIMASHEFF, 1972; ARAKAWA et al., 2007).

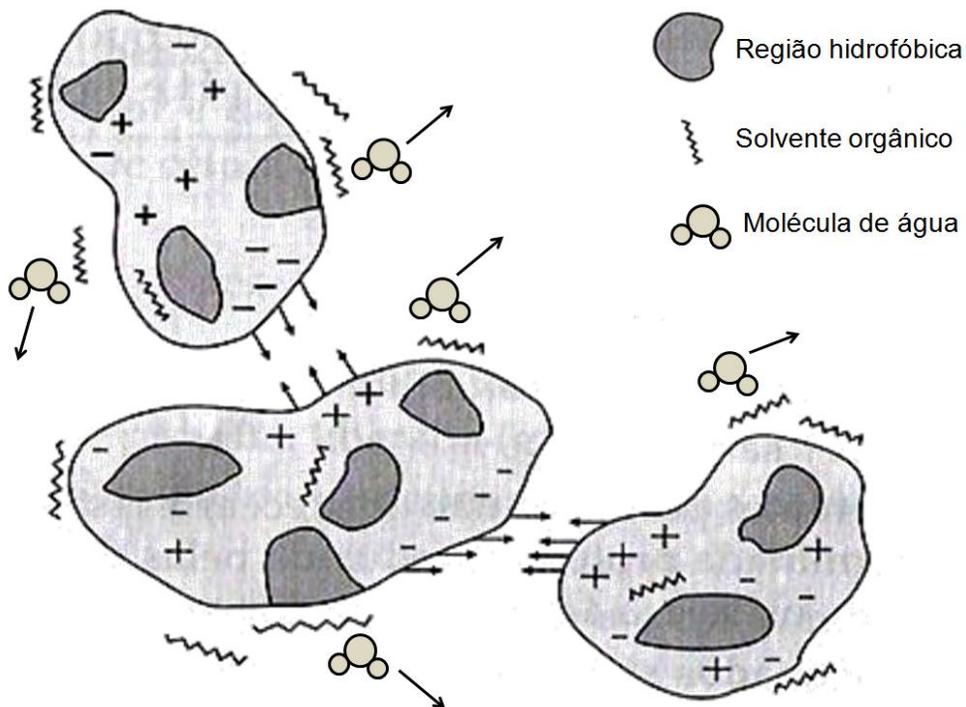


Figura 2.3: Agregação de proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas opostas em meio aquoso contendo solvente orgânico. Adaptado de SCOPES (1987).

Sabe-se que em uma proteína em solução aquosa com o pH igual ao seu ponto isoelétrico (pI), a carga líquida da proteína é zero resultando em uma solubilidade mínima da proteína nesta condição (MING et al., 2004). Por outro lado, a valores de pH acima ou abaixo do seu pI, a carga

eletrostática líquida torna-se maior e proteínas tendem a ser solúveis (OSS, 1989). Na água, assim como em solventes orgânicos, o controle da solubilidade da proteína é dominado pelas forças de repulsão eletrostática e isso explica a baixa solubilidade da proteína em solução com o pH igual ao seu pI (CROWELL et al., 2013). Assim, em uma precipitação com o pH da solução ajustado ao pI da proteína existe a possibilidade da utilização de uma concentração de solvente menor que a utilizada em uma precipitação no pH distante do pI (MING et al., 2004).

Na precipitação por ação de solventes orgânicos um parâmetro crítico do processo é a temperatura. O aumento da temperatura do sistema, resultante da mistura solvente-solução aquosa (TSCHELIOESSNIG et al., 2014), aumenta a flexibilidade da proteína, facilita o acesso do solvente ao interior da proteína e as interações entre este e os sítios hidrofóbicos internos da proteína. Esse conjunto de eventos pode provocar a desnaturação irreversível da proteína pelo rompimento das suas estruturas secundárias. Entretanto, este efeito pode ser minimizado pela redução da temperatura do sistema para valores próximos ou abaixo de 0 °C (COHN et al., 1946; OSS, 1989; SOARES et al., 2012).

O efeito da força iônica, pela adição de sal, no processo de precipitação por solventes orgânicos baseia-se no modelo de emparelhamento de íons segundo o qual, o emparelhamento dos íons com as cargas da superfície das proteínas anulam as forças eletrostáticas repulsivas responsáveis pela solubilidade da proteína em solução (MARCUS e HEFTER, 2006). Crowell et al. (2013) registraram a melhora na eficiência da precipitação de proteínas com acetona pelo aumento da força iônica com a adição de NaCl. Estes autores também relataram que os resultados de recuperação não são específicos para o NaCl, uma vez que, resultados parecidos foram obtidos pela inclusão de outras espécies iônicas como KCl, componentes de tampões como Tris ou detergentes iônicos como SDS. Além disso, neste mesmo trabalho, resultados preliminares para outros solventes orgânicos (ex: alcoóis e acetonitrila) demonstram que a força iônica desempenha um papel importante na eficiência da precipitação de proteínas.

O tamanho das moléculas de proteína é outro fator que afeta a precipitação com solvente orgânico. No estudo da relação entre a concentração do solvente orgânico e o tamanho da proteína foi constatado que as moléculas de menor tamanho necessitam de uma concentração maior de solvente para a sua precipitação (SCOPES, 1987). Oh et al. (2011) realizaram a separação de proteínas de uma solução, contendo proteínas com diferentes massas moleculares

(na faixa de 23 a 200 kDa), por precipitação com etanol apenas variando a concentração do precipitante. Neste estudo, proteínas com massa molecular de 200 kDa foram precipitadas com a concentração de etanol de 25% (v/v). Proteínas com massa molecular na faixa de 37 a 174 kDa foram precipitadas quando a concentração de etanol foi elevada a 75% e as proteínas com massa molecular de 23 kDa não foram detectadas nos precipitados obtidos na faixa de concentração de etanol estudada.

Em termos de constante dielétrica, o poder de solvatação da água pura no caso de uma molécula de enzima hidrofílica diminui com o aumento da concentração do solvente. Isto pode ser descrito como a redução da constante dielétrica ou simplesmente em termos do volume de água deslocado mais a imobilização parcial das moléculas de água através da hidratação do solvente orgânico (AVELINO, 1997). Como a constante dielétrica dos solventes orgânicos miscíveis em água é sempre menor do que a constante dielétrica da água estando eles na mesma temperatura, a solubilidade de uma proteína tende a ser menor em uma mistura solvente orgânico-água do que somente em água. A Tabela 2.7 apresenta as constantes dielétricas (ϵ) da água e dos principais solventes orgânicos utilizados no processo de precipitação de proteínas.

Tabela 2.7: Constantes dielétricas a 20°C, da água e dos principais solventes orgânicos usados na precipitação de proteínas.

Solvente	Constante dielétrica (ϵ)
Água	80,1
Metanol	33,0
Etanol	25,3
Acetona	21,0
N,N-dimetilformamida (DMF)	38,3
Dimetilsulfóxido (DMSO)	47,2

Fonte: LIDE, 2005.

A volatilidade dos solventes orgânicos permite a sua remoção, recuperação e reciclo e as suas propriedades bactericidas são também apreciáveis. Por outro lado, a principal desvantagem da utilização de solventes orgânicos é a sua tendência a causar danos estruturais à proteína. Além

disso, a influência da constante dielétrica na solubilidade é muito sensível à temperatura. O efeito da temperatura sobre a constante dielétrica de líquidos é mostrado na equação proposta por Srivastava e Varshni (1956) (Equação 2.1).

$$\varepsilon = A + [B / (T + C)] \quad (\text{eq. 2.1})$$

na qual

ε = constante dielétrica

T = temperatura em escala absoluta (K)

A , B e C = constantes específicas para cada substância.

Isso exige que a operação seja realizada em temperatura baixa e constante (variação de $\pm 0,5$ °C). A inflamabilidade dos alcoóis inferiores se apresenta como outro problema para operação em larga escala, na qual a necessidade de uma planta à prova de explosão aumenta o custo de capital (BELL et al., 1983).

2.3.3. Precipitação de proteínas com etanol

O etanol é um dos mais importantes precipitantes industriais e provavelmente representa o equilíbrio ideal entre o efeito sobre a solubilidade e o caráter hidrofílico adequado para reduzir a desnaturação de proteínas. A sua utilização para o processo de precipitação apresenta-se como uma das melhores técnicas e permite que a sua aplicação possa ser estendida a diferentes proteínas (CUI et al., 2007; GULUNSKI et al., 2011). Entre as suas vantagens estão a miscibilidade em água, a não formação de misturas gasosas explosivas em condições normais de trabalho, a possibilidade de ser evaporado, ser de baixa reatividade química, ter baixa toxicidade, reduzir o ponto de congelamento da água, ser barato e facilmente disponível (TSCHELIOESSNIG et al., 2014).

Dependendo do objetivo final, no processo de precipitação de proteínas o etanol pode ser usado de várias maneiras. Ele pode ser utilizado em altas concentrações em processos diretos de

precipitação cujo objetivo é a obtenção de concentrado proteico para utilização direta ou posterior purificação (FADEL, 2001; VARMA et al., 1999). Por outro lado, a variação gradativa da constante dielétrica do meio pela adição de etanol permite a precipitação seletiva de proteínas com diferentes solubilidades em diferentes concentrações de etanol (SCOPES, 1987). Esta característica permite a obtenção de um precipitado com maior grau de pureza pela realização de precipitação em etapas na qual a primeira precipitação é realizada em baixa concentração de etanol visando a precipitação e remoção de proteínas totais diferentes das de interesse. Em seguida a concentração de etanol no sobrenadante é elevada para a precipitação das enzimas ativas com uma menor concentração de proteínas totais. Essa operação eleva a atividade específica da enzima e, conseqüentemente, a pureza do produto final (CORTEZ et al., 1998; CORTEZ e PESSOA JR, 1999). Comumente, esta precipitação em duas etapas é chamada de precipitação com corte.

Uma das mais conhecidas aplicações da precipitação com etanol é na purificação de componentes do plasma humano pelo processo Cohn (COHN et al., 1946; COHN et al., 1950) no qual é realizada uma série de precipitações com etanol na temperatura entre -10 e 0 °C. Apesar de simples, desde a década de 1940 quando foi estabelecido, este processo ainda é utilizado, apenas tendo sofrido modificações para melhorar o rendimento e a pureza das proteínas precipitadas (BUCHACHER e IBERER, 2006). O princípio básico desta técnica, é a variação dos cinco parâmetros (pH, força iônica, concentração de etanol, concentração de proteína e temperatura) e é o mesmo para cada etapa do processo de fracionamento de proteínas do plasma (TSCHELIOESSNIG et al., 2014).

O efeito do pH na solubilidade da proteína em um sistema etanol-água é bastante conhecido. Porém, em alguns sistemas não é possível otimizar as precipitações com o pH ajustado ao pI das proteínas devido às alterações no pH do meio, resultantes da adição de etanol na solução. Cortez e Pessoa Jr. (1999) nas precipitações de xilanase e β -xilosidase de *P. janthinellum* com etanol relataram variações de 0,3 unidades de pH com a utilização de etanol na concentração de 20% (v/v) e de 1,9 unidade de pH nos meios onde foram adicionados 80% de etanol.

Na precipitação com etanol alguns cuidados devem ser tomados com o objetivo de eliminar os efeitos negativos do etanol sobre as proteínas. A manutenção da baixa temperatura do

sistema (abaixo ou próximo a 0 °C) e a adição lenta de precipitante ajuda a reduzir o risco de desnaturação da proteína e possível perda de atividade causada pelo excesso de calor resultante da mistura de etanol concentrado com a solução proteica (TSCHELIOESSNIG et al., 2014).

2.3.4 Mecanismo de formação dos precipitados

O termo precipitação refere-se, geralmente, à formação relativamente rápida de uma fase sólida moderadamente solúvel a partir de uma solução em fase líquida e envolve a ocorrência de nucleação, crescimento de cristais, e de outros processos, tais como a maturação de Ostwald e aglomeração. Estes processos acontecem de forma rápida e simultânea, o que torna difícil a investigação experimental de cada um deles separadamente (KARPINSKI e WEY, 2002).

2.3.4.1 Solubilidade e supersaturação como base para a formação dos precipitados

Em um sistema de dois componentes no qual as fases sólida e líquida coexistem, assumindo que um componente cristaliza como uma entidade química, isto é, não formam sólidos com o solvente, o estado de equilíbrio termodinâmico pode ser expresso como a igualdade de potenciais químicos do componente em ambas as fases (Equação 2.1) (MULLIN, 2001).

$$\mu_1^l = \mu_1^s \quad (\text{eq. 2.2})$$

na qual, μ_1 é o potencial químico do componente 1 nas fases líquida (l) e sólida (s), para os quais,

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln \alpha_1 \quad (\text{eq. 2.3})$$

com, $\alpha_1 = \gamma_1 x_1$

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln \gamma_1 x_1 \quad (\text{eq. 2.4})$$

Para um componente puro anidro com a temperatura e a pressão do sistema no estado padrão a_i é a sua atividade, γ_i seu coeficiente de atividade e x_i a sua fração molar na solução.

A supersaturação é o parâmetro chave para a precipitação e o seu nível na solução regula as taxas dos processos intrínsecos a ela, tais como nucleação, crescimento e a maturação de Ostwald (KARPINSKI e WEY, 2002). Em alto nível de supersaturação, a precipitação procede rapidamente e um grande número de núcleos são gerados resultando em um aumento de precipitado. A supersaturação é normalmente obtida através de reação química, adição de anti-solvente, adição de sal “salting out” ou da alteração no pH. Em uma condição de elevada supersaturação a nucleação primária heterogênea é geralmente dominante, mas em alguns casos pode ocorrer nucleação homogênea (GIULIETTI et al., 2001).

Segundo Karpinski e Wey (2002), quando um precipitado coexiste em equilíbrio com a solução, a constante de equilíbrio que representa a interface é o produto de solubilidade, K_{sp} . Para um eletrólito $a_A^+ a_B^-$, a supersaturação S é definida como a razão entre o produto da atividade e o produto de solubilidade baseado nas atividades, segundo as Equações 2.5, 2.6 e 2.7.

$$\pi = a_A a_B \quad (\text{eq. 2.5})$$

na qual π é o produto das atividades das espécies e a é a atividade das espécies iônicas

$$K_{sp} = a_{Aeq} a_{Beq} \quad (\text{eq. 2.6})$$

na qual a é a atividade das espécies iônicas e o produto de solubilidade, K_{sp} , representa o valor de atividade do produto no estado de equilíbrio. O índice “eq” designa que tais atividades exigem equilíbrio.

$$S = \pi / K_{sp} \quad (\text{eq. 2.7})$$

na qual, S é supersaturação, π é o produto da atividade e K_{sp} é o produto de solubilidade.

Segundo Mullin (2001), a supersaturação de um sistema pode ser expressa de diversas maneiras e considerável confusão pode ser causada se as unidades básicas de concentrações não são claramente definidas. Entre as expressões mais comuns para a supersaturação esta a relação

da força motriz concentração, Δc , com a supersaturação, S . Pode-se referir à supersaturação como absoluta (S), relativa (σ) ou supersaturação percentual (100σ). Estas são definidas como:

$$\Delta c = c - c^* \quad (\text{eq. 2.8})$$

$$S = c / c^* \quad (\text{eq. 2.9})$$

$$\sigma = \Delta c / c^* = S - 1 \quad (\text{eq. 2.10})$$

em que c é a concentração da solução e c^* é a saturação de equilíbrio a uma dada temperatura.

2.3.4.2. Nucleação

A nucleação é a formação de uma fase sólida resultante do aumento da supersaturação em uma solução isenta de sólidos. Porém, a formação da fase sólida (energeticamente favorável) implica na geração de uma interface (energeticamente desfavorável). Para que ocorra nucleação, a barreira de energia deve ser ultrapassada. Essa barreira é importante principalmente nas fases iniciais da nucleação, quando apenas algumas moléculas ou íons da solução se juntam formando núcleos estáveis “cluster” que devem atingir um tamanho crítico, caso contrário eles se redissolvem (GIULIETTI et al., 2001). A nucleação pode ocorrer através de dois mecanismos: nucleação primária, que ocorre na ausência de material cristalizado ou nucleação secundária, que é provocada pela presença de material cristalizado (KARPINSKI e WEY, 2002). (Figura 2.4).

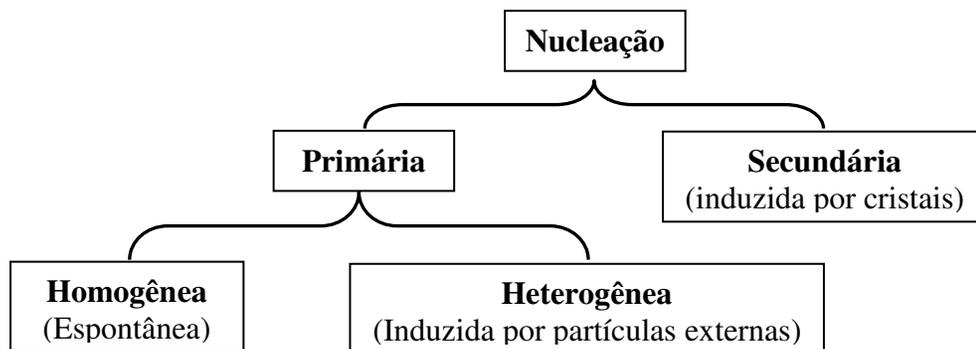


Figura 2.4: Esquema de classificação dos tipos de nucleação (Adaptado de MULLIN, 2001).

A – Nucleação primária

Na nucleação primária, se a formação da nova fase sólida não é causada pela presença de qualquer fase sólida, esta é denominada homogênea ou espontânea. Por outro lado, se a formação da nova fase sólida é induzida pela presença de fase sólida externa, o processo é denominado heterogêneo (KARPINSKI e WEY, 2002).

Para a nucleação primária homogênea, a expressão desenvolvida por Nielsen (1964) descreve a velocidade dessa nucleação:

$$J = (D/d_m^5 N^*) (4\Delta G^*/3\pi kT)^{1/2} \exp(-\Delta G^*/kT) \quad (\text{eq. 2.11})$$

$$J = \Omega \exp(-\Delta G^*/kT) \quad (\text{eq. 2.12})$$

na qual D é o coeficiente de difusão do soluto, d_m é o diâmetro molecular, N^* é o número de íons ou moléculas que formam o cristal, ΔG^* é a variação da energia livre de Gibbs em função de N^* , k é a constante de Boltzmann ($1,38066 \times 10^{-23}$ J/K), T é a temperatura e Ω é um fator de frequência pré-exponencial.

A dependência da velocidade de nucleação em relação à supersaturação é dada por:

$$J = \Omega \exp[-16\pi\sigma^3 v^2 / 3k^3 T^3 (\ln S)]^2 \quad (\text{eq. 2.13})$$

$$J = \Omega \exp[-B/(\ln S)^2] \quad (\text{eq. 2.14})$$

na qual B é uma constante definida como:

$$B = (16\pi\sigma^3 v^2) / (3k^3 T^3) \quad (\text{eq. 2.15})$$

Para intervalos limitados de supersaturação, a equação 2.15 pode ser simplificada para:

$$J = k_N S^n \quad (\text{eq. 2.16})$$

na qual k_N é a constante de velocidade de nucleação e n é a ordem cinética de nucleação.

Na nucleação primária heterogênea, partículas estranhas geralmente contidas na solução atuam como substratos para a nucleação (GIULIETTI et al., 2001). Segundo Sohnel e Garside (1992), mesmo em líquidos, do qual as impurezas foram removidas, podem conter de 10^{13} a 10^{23} partículas de contaminantes por m^3 . A Equação 2.17 (cuja forma corresponde à da Equação 2.12 para a nucleação homogênea) proposta por Turnbull e Vonnegut (1952) avalia a taxa de nucleação heterogênea.

$$J_{het} = \Omega_{het} \exp(-\Delta G_{het}^*/kT) \quad (\text{eq. 2.17})$$

na qual $\Omega_{het} < \Omega$.

O tempo que decorre entre a mistura das soluções e o aparecimento dos primeiros cristais de precipitado é denominado período de indução. Em sistemas diluídos a reação ou a precipitação começa lentamente, seguida de aceleração e, eventualmente, fica mais lento. O período de indução t_{ind} tornou-se uma base experimental para determinar a taxa de nucleação J , utilizando uma relação simples (Equação 2.18) (KARPINSKI e WEY, 2002).

$$J = K/t_{ind} \quad (\text{eq. 2.18})$$

em que K é uma constante.

Ao combinar as Equações 2.16 e 2.18 obtém-se a Equação 2.19 e esta tem sido utilizada para caracterizar o mecanismo de nucleação.

$$t_{ind} = (K/k_N) S^{-n} \quad (\text{eq. 2.19})$$

Uma vez formados, parte dos núcleos crescem sob condições de supersaturação locais. Ao mesmo tempo, outra parte pode dissolver gradualmente tornando-se fonte de soluto para o crescimento dos núcleos sobreviventes pelo aumento da supersaturação do sistema. O resultado desse processo é o estabelecimento de uma população de núcleos estáveis nos primeiros minutos de precipitação (KARPINSKI e WEY, 2002).

B – Nucleação secundária

Quando uma solução supersaturada está em contato com as partículas de cristal, a largura da zona metaestável diminui e novos núcleos são formados através de um mecanismo de nucleação secundária. Entretanto, para sistemas com período de indução muito curto o mecanismo de nucleação primária prevalece (GIULIETTI et al., 2001).

As colisões que acontecem na nucleação secundária, importante em operações de cristalização porque produz uma variedade cristais com alcance de milímetro, raramente é motivo de preocupação nos processos de precipitação, pois, durante o processo de precipitação os cristais produzidos são muito pequenos ($<100 \mu\text{m}$) e estes seguem as linhas de corrente dentro dos vórtices e raramente entram em colisão com o misturador, defletores, paredes do precipitador ou outros cristais. Devido o tamanho submícron dos cristais, mesmo que ocorram colisões estas são de baixo impacto e não produzem núcleos secundários. Embora as colisões que ocorrem na nucleação secundária não seja o principal mecanismo da formação de núcleos na precipitação núcleos podem, em alguns casos, ser gerados por meio deste mecanismo (KARPINSKI e WEY, 2002).

2.3.4.3. Crescimento de cristais

Uma vez formados, os núcleos começam a crescer em cristais. Várias teorias têm sido propostas para descrever o mecanismo e a velocidade de crescimento desses cristais. Dois processos principais ocorrem sequencialmente durante o crescimento dos cristais a partir da solução: A – transporte de massa de unidades de crescimento a partir da solução supersaturada à interface de solução de cristais por difusão e B – incorporação de unidades de crescimento na estrutura do cristal durante o processo de integração superfície também chamado de reação de superfície (KARPINSKI e WEY, 2002).

A – Crescimento controlado por transporte de massa

O modelo mais simples de transporte de massa é a difusão de grandes quantidades de unidades de crescimento através de uma camada de difusão estagnada adjacente à superfície do

crystal. Para obter uma camada de difusão de espessura δ , a taxa de crescimento linear G , pode ser derivada através da integração da lei de Fick (Equação 2.20).

$$G = (4D/\rho_c)[(1/L) + (1/2\delta)] (C - C_i) \quad (\text{eq. 2.20})$$

em que D é o coeficiente de difusão, ρ_c é a densidade de cristal, L é o tamanho do cristal (comprimento da aresta ou diâmetro), C é a concentração do soluto e C_i é a concentração de soluto na interface solução-cristal.

Embora a Equação 2.20 tenha sido derivada principalmente para um cristal esférico, ela pode também ser aplicada, para a primeira aproximação, a outras formas de cristal tais como cúbica, octaédrica entre outras (KARPINSKI e WEY, 2002).

B – Crescimento controlado por integração de superfície

A Integração de superfície é o processo pelo qual as unidades de crescimento do material de cristalização são incorporadas na rede cristalina após terem sido transportadas para a superfície do cristal (KARPINSKI e WEY, 2002). Para Mullin (2001), os três mecanismos que controlam a integração de superfície são: i) o crescimento espiral, ii) o crescimento por nucleação bidimensional e iii) o crescimento áspero.

i) Crescimento em espiral

Neste mecanismo, a baixas supersaturações, unidades de crescimento são incorporadas apenas com dobras na superfície do cristal (Figura 2.5): primeiro um defeito deve ser gerado na camada de crescimento da superfície e, em seguida, sobre este defeito se forma uma camada de deslocamento em espiral (MULLIN, 2001).

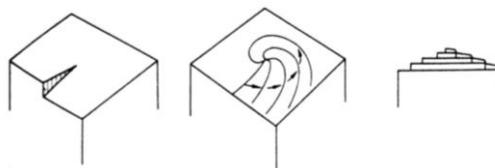


Figura 2.5: Evolução do crescimento em espiral (MULLIN, 2001).

ii) Crescimento por nucleação bidimensional

Neste mecanismo, em supersaturações relativamente altas são geradas dobras que são necessárias para o progresso do crescimento dessa forma a nucleação bidimensional se desenvolve na superfície do cristal (Figura 2.6). Se a taxa de crescimento lateral dos núcleos bidimensionais é elevada em comparação com a velocidade de nucleação, a superfície é lisa (MULLIN, 2001).

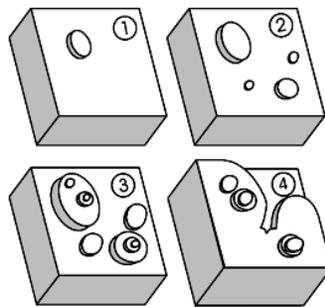


Figura 2.6: Evolução do crescimento por nucleação bidimensional (Fonte: GIULIETTI et al., 2001).

iii) Crescimento rugoso

Quando a supersaturação é ainda mais elevada, as unidades de crescimento são anexadas em qualquer lugar na superfície do cristal (terraços, degraus ou torções), de modo que a superfície do cristal torna-se rugosa (Figura 2.7). Para os compostos orgânicos, a transição entre o crescimento liso e rugoso pode ser obtida pelo aumento a supersaturação ou da temperatura (GIULIETTI et al., 2001).

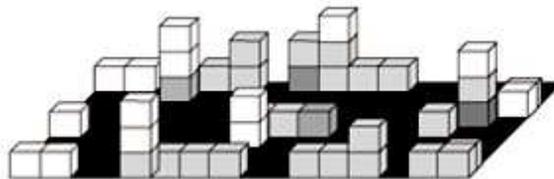


Figura 2.7: Evolução do crescimento rugoso (Fonte: GIULIETTI et al., 2001).

2.3.4.4. Maturação de Ostwald

Um sistema heterogêneo, com uma fase sólida em estado de dispersão, é instável termodinamicamente até que a sua energia livre tenha atingido um nível mínimo. Isto porque a grande área interfacial contribui para a energia livre, que pode ser reduzida, diminuindo desta área. Este processo é conhecido como "maturação de Ostwald". A sua força motriz é a diferença na solubilidade entre as partículas da fase sólida, decorrente da diferença de tamanho dessas partículas. Esta diferença de solubilidade estabelece um gradiente de concentração que leva ao transporte de material do soluto através da fase da solução dos cristais menores para os maiores. A taxa do processo de amadurecimento é determinada pela distribuição de tamanho dos cristais, das cinéticas de crescimento e de dissolução e pelas propriedades de transporte da fase de solução (KARPINSKI e WEY, 2002).

A equação de Gibbs-Thomson relaciona a solubilidade com o tamanho do cristal (Equação 2.21), de acordo com a qual, a solubilidade de uma substância aumenta com a diminuição de tamanho de cristal, esta maior solubilidade de cristais menores é resultado, principalmente, das forças de tensão superficial entre o cristal e a solução. Para o equilíbrio cristal-solução, a solubilidade de cristais esféricos de raio r está relacionada com a solubilidade de cristais de tamanhos muito grandes pela Equação 2.21.

$$\ln C_{eq}(r)/C_{eq}(\infty) = 2\sigma V_m/RT r \quad (\text{eq. 2.21})$$

na qual $C_{eq}(r)$ é a solubilidade de cristais esféricos de raio r , $C_{eq}(\infty)$ é a solubilidade de cristais de tamanhos muito grandes, σ é a energia de superfície da fase sólida, V_m é o volume molar, R é a constante universal dos gases ($8,31451 \text{ J/mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta.

2.3.4.5. Aglomeração

A aglomeração das partículas tem papel importante nos processos de precipitação devido a alta concentração de pequenas partículas envolvidas nesses sistemas. Nos processos de precipitação, os números de partículas e a distribuição de tamanho destas podem ser

influenciados de forma significativa pela ocorrência de aglomeração (KARPINSKI e WEY, 2002).

Segundo Giulietti et al. (2001), se as partículas têm energia cinética suficiente para superar a repulsão devido ao seu potencial de superfície, elas colidem. Se mantiverem em contato tempo suficiente um aglomerado é formado. Dentre as variáveis que afetam a aglomeração durante a precipitação estão:

- 1) A intensidade da mistura – aumenta a frequência de colisão de partícula e, portanto, a agregação. No entanto, uma intensidade de mistura demasiadamente elevada promove a ruptura das partículas.
- 2) A concentração de sólidos – também aumenta a frequência de colisão à segunda potência (uma vez que duas partículas estão envolvidas em cada colisão).
- 3) O pH – este tem forte efeito sobre o potencial de superfície. Cada composto tem um pH em que a superfície das partículas é eletricamente neutra (o ponto isoelétrico). A este pH, a repulsão partícula-partícula é minimizada e a agregação é facilitada.
- 4) A força iônica – quando elevada, deprime a camada dupla elétrica, facilitando assim a agregação.
- 5) A supersaturação – se for elevada, ela diminui o tempo necessário para a ligação do conjunto de partículas, facilitando deste modo a agregação.

As propriedades das partículas precipitadas são de fundamental importância e grande atenção deve ser dada ao "design das partículas". Muitas propriedades dos precipitados são de natureza física (tamanho do cristal, distribuição e morfologia) e podem afetar os processos pós-precipitação como filtração, secagem, etc. Outras propriedades são de natureza química, por isso, a composição química representada pelos níveis de pureza e de impurezas químicas deve ser controlada (KARPINSKI e WEY, 2002).

Muitos precipitados podem formar uma variedade de polimorfos. O polimorfismo ocorre quando existe mais de um arranjo possível de solutos numa rede cristalina. Os polimorfos são,

portanto, compostos quimicamente idênticos, mas com diferentes estruturas cristalinas que se comportam de forma diferente em termos da sua solubilidade, taxas de nucleação e crescimento, etc. Devido às suas grandes dimensões, as moléculas orgânicas e biomoléculas têm muitos polimorfos, muito semelhantes um ao outro, de modo que produtos de precipitação são frequentemente misturas de polimorfos (GIULIETTI et al., 2001).

Na maioria dos casos, apenas uma modificação polimórfica específica é aceitável e, portanto, as condições de precipitação devem ser controladas a fim de se obter o produto desejado. Além disso, na obtenção de partículas é necessário assegurar a reprodutibilidade das propriedades das partículas de lote para lote. Em todas as aplicações industriais, desafios significativos ainda existem na intensificação dos processos de precipitação que envolve reação química rápida de reagentes concentrados (KARPINSKI e WEY, 2002).

2.3.5. Utilização da técnica de semeadura em cristalização

A cristalização é uma técnica de separação e purificação utilizada na indústria para produzir uma grande variedade de produtos. Esta pode ser definida como uma mudança de fase em que um produto cristalino é obtido a partir de uma solução. Caracteriza-se como um dos mais complexos métodos de separação devido aos diversos fenômenos que ocorrem de forma simultânea, tais como, transferência de calor e massa, mudança de fase, dissolução, aglomeração, dentre outros (MYERSON, 2002). Um dos paradoxos em cristalização é que as condições ótimas da solução para a nucleação dos cristais não são as ideais para o seu crescimento posterior, pois, é mais provável que ocorra a nucleação espontânea quando os níveis de supersaturação são elevados, enquanto que o crescimento lento e ordenado dos cristais é favorecido por níveis mais baixos de supersaturação. Assim, idealmente, a cristalização deve de alguma forma desacoplar a nucleação do crescimento para satisfazer os diferentes requisitos dos dois eventos. A utilização de semente é uma ferramenta poderosa para a separação da fase de nucleação da fase de crescimento dos cristais. Nesta técnica, cristais pré-existentes são utilizados como sementes e introduzidos nas soluções a serem cristalizadas, estando a solução a níveis mais baixos de saturação. A técnica de semeadura também é útil para eliminar o tempo de nucleação e aumentar a tendência da formação de cristais isomorfos (BERGFORS, 2003).

Uma opção para o melhoramento da qualidade dos cristais de nucleação (sementes), seja por micro ou macrosemeadura, é a semeadura de série. Neste caso, os cristais resultantes da primeira rodada de experimentos são utilizados como sementes para os novos experimentos. Os cristais obtidos na segunda rodada de experimentos são usados como sementes para uma terceira rodada de experimentos e assim por diante (THALLER et al., 1981).

Caso não haja cristais ou microcristais com características próximas das proteínas contidas na solução, pode-se realizar a semeadura com qualquer fase sólida. Em alguns casos o uso desta fase sólida apresenta efeito de agregação, pois mesmo os óleos e os precipitados também podem atuar como núcleos (agregados ordenados) para maior crescimento de cristal (STURA e WILSON, 1991).

Com base no tamanho das sementes, as técnicas de semeadura podem ser classificadas em duas categorias: microsemeadura, transferência de sementes submicroscópicas, pequenas demais para serem distinguidas individualmente, e macrosemeadura, transferência de sementes, geralmente com tamanhos que variam de 5 a 50 μm . Para a otimização do processo de cristalização, o uso de sementes pode requerer otimização do conjunto com variáveis de processo, tais como as concentrações de precipitantes e de proteínas, ajuste do pH ou a adição de aditivos (BERGFORS, 2003).

Apesar da utilização da técnica de semeadura ser uma estratégia usada com sucesso em processos de cristalização (CARBONE et al., 2005; CARBONE e ETZEL, 2006; D'ARCY et al., 2007), durante a presente revisão bibliográfica não se encontraram na literatura relatos da sua aplicação como estratégia na etapa de precipitação de proteínas contidas em sistemas complexos tais como fermentados, extratos dentre outros.

2.3.6. Precipitação de xilanases

Diferentes protocolos de precipitação de xilanases de diferentes fontes têm sido estudados visando uma melhor recuperação quantitativa e qualitativa destas enzimas. A Tabela 2.8 apresenta os resultados de recuperação da atividade xilanásica e fator de purificação obtido em alguns trabalhos de precipitação de xilanases por diferentes técnicas.

Tabela 2.8: Precipitação de xilanases por diferentes métodos.

Fonte	Técnica de precipitação	X _R (%)	F _p	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Polímero Eudragit S100	83,8	4,5	BRECCIA et al., 1998
<i>Penicillium janthinelum</i>	Sulfato de sódio 25 (% v/v)*	< 80,0	-	CORTEZ et al., 1998
	Sulfato de amônio (% m/v)			
<i>Penicillium glabrum</i>	90	84,2	3,3	KNOB et al, 2013
<i>Aspergillus niger</i>	80*	27,0	-	FARINAS et al., 2011
<i>Aspergillus aculeatus</i>	80	97,1	5,0	FUGIMOTO et al., 1995
<i>Bacillus cereus</i>	80	51,8	1,2	ROY e ROWSHANUL, 2009
<i>Aspergillus niger</i>	70*	78,6	1,9	AHMAD et al., 2013
<i>Trichoderma viride</i>	60*	81,9	1,1	IRFAN e SYED, 2012
<i>Bacillus pumilus</i>	50	40,4	6,8	MAHILRAJAN et al., 2014
<i>Aspergillus terreus</i>	40	15,5	3,0	PAL et al., 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	64,0	1,5	FADEL et al. 2014
<i>Anoxybacillus SP</i>	40	-	1,3	HAULI et al., 2013
<i>Trichoderma harzianum</i>	40	41,8	-	FADEL, 2001
	30	64,0	-	
<i>Streptomyces sp.</i>	40 / 70	50,3	1,8	WATEEWUTHAJARN e PINPHANICHAKARN, 2000
<i>Aspergillus flavus</i>	35 / 70	48,9	2,1	MILALA et al., 2013
<i>Alternaria alternate</i>	40 / 80	78,8	1,3	DOLMA et al., 2014
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	35 / 80	84,7	1,4	KAMBLE e JADHAV, 2012
<i>Aspergillus sp 5</i>	30 / 80	62,0	2,2	GAWANDE e KAMAT, 1999
<i>Aspergillus sp 44</i>	30 / 80	67,5	3,7	
<i>Penicillium janthinelum</i>	20 / 80	87,0	1,5	ABIRAMI et al., 2011
<i>Neurospora crassa</i>	20 / 80	59,0	1,1	
	Acetona (% v/v)			
<i>Chainia sp.</i>	80	87,7	3,8	VARMA et al., 1999
<i>Aspergillus niger</i>	75	-	1,3	BENEDETTI et al., 2013
<i>Chainia sp.</i>	66	93,5	8,7	VARMA et al., 1999
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	86,2	2,7	FADEL et al. 2014

Continua

Tabela 2.8, continuação

	Etanol (% v/v)			
<i>Trichoderma harzianum</i>	90	100,0	-	MARIÑO et al., 2015
	80	97,0	-	FADEL, 2001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	80	55,0	-	FADEL et al. 2014
<i>Chainia</i> sp.	80	99,0	16,0	VARMA et al., 1999
	66	78,5	13,7	
<i>Aspergillus niger</i>	80	23,0	-	FARINAS et al., 2011
<i>Trichoderma harzianum</i>	40	7,9	-	FADEL, 2001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	68,6	1,3	FADEL et al. 2014
<i>Penicillium janthinellum</i>	20; 60; 80	8,0; 74,0; 6,0 6,0; 7,0; 81,0	-	CORTEZ e PESSOA JR, 1999
	40 / 80	100,0		CORTEZ et al., 1998

* Uso de soluções saturadas; indica-se o percentual final de volume da solução saturada de do sal adicionado. X_R , atividade xilanásica recuperada; F_p , fator de purificação.

No trabalho de Cortez et al. (1998), xilanases de *Penicillium janthinellum* foram precipitadas utilizando sulfato de sódio como agente precipitante. Na precipitação com a concentração de 25% (v/v) de solução saturada de sulfato de sódio menos de 80% da atividade xilanásica inicial foi recuperada. Em concentrações de solução saturada de sulfato de sódio acima de 25%, a enzima foi desnaturada. Esses resultados mostram que para esse sistema 25% v/v é a concentração máxima limite de sulfato de sódio possível de ser utilizada.

A precipitação com sulfato de amônio foi o método mais utilizado para a precipitação de xilanases. Este precipitante foi utilizado de forma direta ou em precipitação em etapas (com corte). Nas precipitações diretas as concentrações de sulfato de amônio utilizadas variaram de 30 a 90% de saturação, nestas observa-se que para concentrações menores ou iguais a 50% a recuperação da atividade enzimática é relativamente baixa alcançando no máximo 64% da atividade inicial (MAHILRAJAN et al., 2014; FADEL, 2001; FADEL et al. 2014; PAL et al., 2006; HAULI et al., 2013; FADEL, 2001). O fator de purificação também seguiu essa tendência com exceção para os trabalhos de Pal et al. (2006) e Mahilrajan et al. (2014), que apresentaram fatores de purificação de 3,5 e 6,8, respectivamente. Nas precipitações com concentrações de

sulfato de amônio iguais ou maiores que 60%, os trabalhos de Knob et al. (2013), Fugimoto et al. (1995) e Irfan e Syed (2012) apresentaram recuperação de atividade enzimática acima de 80%.

Caso interessante foi observado na precipitação de xilanases de *Aspergillus niger* no qual Farinas et al. (2011) recuperam 27% da atividade xilanásica inicial utilizando 80% de sulfato de amônio, enquanto Ahmad et al. (2013), utilizando um fermentado produzido por uma cepa diferente da mesma espécie, obtiveram até 78,6% de recuperação da atividade de xilanase inicial quando a concentração do precipitante era 70% v/v. Esses resultados abrem a possibilidade de discussão sobre a relação da atividade enzimática recuperada no precipitado com atividade enzimática inicial do complexo enzimático, pois, estudos realizados até hoje raramente caracterizam a precipitação de proteínas por curvas de solubilidade e também não se referem à atividade enzimática possível de ser recuperada. Com vista nessa possibilidade, Pinheiro et al. (2015) propuseram o conceito de solutividade, este conceito pretende agregar em um parâmetro tanto a medida de solubilidade proteica quanto a atividade enzimática recuperável.

Os experimentos realizados com concentrações de sulfato de amônio iguais ou maiores que 70% resultaram em fatores de purificação parecidos com aqueles apresentados para as precipitações com baixa concentração de precipitante e os melhores resultados foram de 3,3 (KNOB et al., 2013) e 5,0 (FUGIMOTO et al., 1995).

No caso das precipitações em duas etapas (com corte), que tem como objetivo principal a purificação, entre os trabalhos listados na Tabela 2.8, apenas Kamble e Jadhav (2012) e Abirami et al. (2011) obtiveram recuperações de atividade xilanásica acima de 80%, porém, os precipitados resultantes apresentaram baixos fatores de purificação (1,4 e 1,5, respectivamente). Por outro lado, os melhores resultados de fator de purificação foram obtidos por Milala et al. (2013) e Gawande e Kamat (1999): 2,1 e 3,7, respectivamente. No entanto, nessas precipitações, as recuperações da atividade xilanásica não ultrapassou 68% da atividade inicial. No tocante à purificação, esses resultados ainda são inferiores àqueles apresentados nas precipitações em etapa única nos quais foram obtidos fatores de purificação de 5,0 (FUGIMOTO et al., 1995) e 6,8 (MAHILRAJAN et al., 2014).

Nas precipitações com acetona destaca-se a baixa concentração de precipitante utilizada no trabalho de Fadel et al. (2014) no qual foi utilizada a concentração de 40% (v/v) e obtido a recuperação de 86% da atividade enzimática inicial, enquanto Varma et al. (1999), utilizando

66% (v/v) do precipitante, obtiveram a recuperações de 93,5% da atividade enzimática inicial com fator de purificação de 8,7. No entanto, quando a concentração de acetona foi elevada para 80% (v/v) a recuperação da atividade teve uma diminuição para 87%.

Para as precipitações realizadas com etanol de forma direta (sem corte), observa-se uma tendência de aumento na recuperação da atividade enzimática com o aumento da concentração de etanol. As precipitações com altas concentrações do precipitante (igual ou maiores que 80%) resultaram em recuperações de mais de 96,0% da atividade inicial (FADEL, 2001; VARMA et al., 1999; MARIÑO et al., 2015). A exceção dessa tendência foi verificada nos estudo realizados por Fadel et al. (2014) e Farinas et al. (2011) nos quais foi utilizada a concentração de 80% (v/v) de etanol, mas a recuperação da atividade de xilanase foi apenas de 55 e 23%, respectivamente, da atividade inicial. Varma et al. (1999) trabalhando com xilanases produzidas por *Chainia* sp. relataram o aumento na atividade específica de 16 vezes em precipitações com 80% de etanol e aproximadamente 14 vezes quando a concentração de etanol era 66%. Esses resultados mostram que para esse sistema o etanol é um precipitante com potencial também na purificação.

Cortez et al. (1998) utilizando a precipitação em duas etapas (com corte) registraram a recuperação total da atividade inicial de xilanase. Nesse estudo, a concentração de etanol de 40% (v/v) foi definida como ponto de corte e a segunda etapa realizou-se com a concentração de etanol de 80%.

Na precipitação sequencial de β -xilosidase e xilanases totais de *Penicilium janthinellum*, Cortez e Pessoa Jr. (1999) relataram estudos para a determinação de possível ponto de corte. A 20% de etanol, 8% de β -xilosidase e 6% de xilanases totais são precipitadas; a 60% de etanol precipitou-se 74% de β -xilosidase e 7% xilanases totais. A 80% de etanol, 6% de β -xilosidase e 81% xilanases totais foram precipitadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismo e substrato sólido

Neste trabalho, o agente fermentador utilizado para a produção dos complexos enzimáticos foi a cepa do fungo *Aspergillus niger* A12 pertencente à coleção de cepas fúngicas da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos/RJ. O substrato sólido para o cultivo foi o farelo de trigo adquirido no comércio local.

3.1.2. Reagentes diversos

Os reagentes utilizados no trabalho estão relacionados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Relação de reagentes utilizados nos ensaios.

Reagente	Fabricante
Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)	Aldrich
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma
Carboximetilcelulose (CMC)	Biotec
Cloreto de cálcio	Synth
Cloreto de cobalto	Biotec
Coomassie Brilliant Blue G-250	Pierce
Etanol	Merck
Fosfato monobásico de potássio	Nuclear
Glicose	Nuclear
Hidróxido de sódio	Vetec
Meio de cultura PDA (batata, dextrose e ágar)	Oxoid
Metabissulfito de sódio	Vetec

Continua

Tabela 3.1: continuação

Papel de filtro nº1	Whatman
Peptona de soja	Isofar
Sulfato de amônio	Synth
Sulfato de ferro heptahidratado	Synth
Sulfato de magnésio heptahidratado	Synth
Sulfato de manganês monohidratado	Nuclear
Sulfato de zinco heptahidratado	Synth
Tampão citrato de sódio	Synth
Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado	Synth
Tween-80	Merck
Xilana de bétula	Sigma

3.1.3. Materiais e equipamentos usados na produção e caracterização dos complexos enzimáticos

Na produção dos extratos e fermentados foi utilizada uma câmara de Neubauer modelo 1110000 da SP Labor para a contagem de esporos, placas de Petri de dimensões 90 mm x 15 mm, frascos Erlenmeyer de 250 mL todos em vidro Pyrex®, autoclave vertical CS (Prismatec, Brasil), estufa bacteriológica TE 392/1 (Tecnal, Brasil) e a água ultrapura foi obtida com o equipamento Milli-Q System (Millipore, EUA). Para os cultivos foi utilizada a câmara de fluxo laminar unidirecional vertical FUV 06 Veco e incubadora shaker TE 4200 (Tecnal, Brasil). As centrifugações foram realizadas em centrífuga 5804 R da Eppendorf (Alemanha). Na caracterização dos extratos e fermentados, feita em termos da atividade enzimática de FPase, CMCase e xilanase, assim como a concentração de proteínas totais e hidrólise de bagaço de cana, foram utilizados tubos de ensaio de 16 x 160 mm em vidro Pyrex®, cubetas em poliestireno de 1,5 mL. As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA).

3.1.4. Materiais e equipamentos usados nos estudos de estabilidade térmica e de pH, determinação do ponto de turvação e precipitação em tubos de ensaio

Para os estudos da estabilidade térmica e estabilidade de pH, os experimentos foram realizados em tubos do tipo Falcon de 15 mL. Na determinação do ponto de turvação em tubos de ensaio foram utilizados tubos de ensaio de 16 x 160 mm em vidro Pyrex®. Em todos os experimentos, as medidas para o ajuste do pH dos complexos, utilizando os tampões citrato de sódio e fosfato de sódio, foram realizadas em pHmetro AXJ – 511 (Micronal, Brasil).

3.1.5. Materiais e equipamentos usados nos estudos de precipitação em tanque agitado

O sistema utilizado para os estudos de precipitação do fermentado em tanque agitado, esquematizado na Figura 3.1, foi projetado pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEBp da FEQ/UNICAMP.

O aparato era composto de um tanque cilíndrico com fundo plano em vidro com volume de trabalho de 100 mL, dimensões 40 mm de diâmetro interno e altura de 100 mm e jaqueta térmica para controle de temperatura (1). O sistema de agitação consistia em um agitador mecânico Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha) e um impelidor com duas pás inclinadas com 25 mm de comprimento, altura de 7,0 mm e inclinação de 45° (2). A distância entre o impelidor e o fundo do tanque era de 20 mm. O fechamento do tanque era feito com uma tampa de teflon com dois furos, um para a passagem do eixo do impelidor outro para a adição de etanol e retirada de amostra. A temperatura do tanque era controlada com precisão de 0,2 °C pela jaqueta térmica alimentada com água por um banho termostatzado TE-2000 (Tecnal, Brasil) (3). A adição de etanol era realizada por uma bomba dosadora Dosimat 665 (Metrohm, Alemanha) (4). O etanol que saía da bomba, na vazão estabelecida, passava pelo sistema de resfriamento composto por uma serpentina de cobre alojada em uma caixa de isopor contendo a mistura de sal e gelo (5). Em seguida, o etanol seguia para o tanque contendo o fermentado.

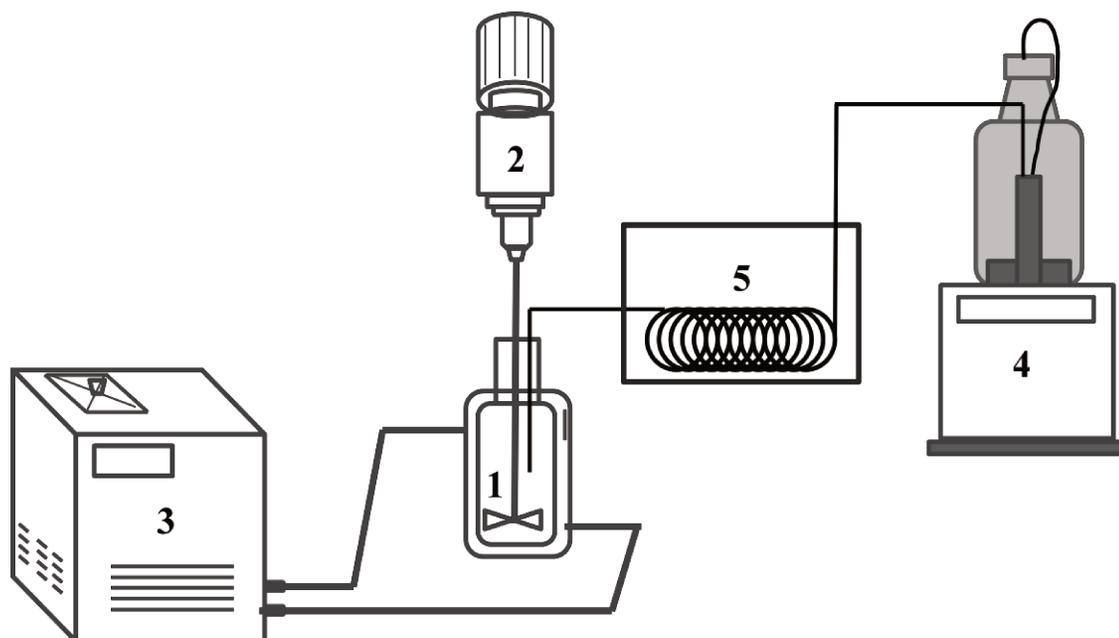


Figura 3.1: Representação esquemática do sistema utilizado para os estudos de precipitação do fermentado enzimático em tanque agitado: 1. tanque de vidro; 2. impelidor; 3. banho termostatizado; 4. bomba dosadora e 5. sistema de resfriamento do etanol.

3.2. Métodos

3.2.1. Escolha do meio de suplementação para a produção dos complexos enzimáticos

3.2.1.1. Preparação do inóculo

A ativação da cepa de *A. niger* foi feita em placa de Petri contendo meio PDA a 30,0 °C por cinco dias. Em seguida, os esporos foram suspensos em 50,0 mL de solução 0,3% de Tween 80 por agitação com a ajuda de uma alça de platina para adequada suspensão dos esporos. A suspensão foi filtrada e a fase líquida armazenada a -18,0 °C. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer utilizando 1,0 mL da suspensão de esporos diluída em água estéril. Todos os procedimentos envolvendo os esporos fúngicos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

3.2.1.2. Preparação dos meios de cultivo

A – Meio Mandels (Mandels e Weber, 1969)

Para a preparação deste meio de suplementação, os reagentes nas quantidades listadas na Tabela 3.2 foram dissolvidos em água destilada, seguido do ajuste do pH da solução em 5,0 com solução de HCl 2,0 mol.L⁻¹.

Tabela 3.2: Composição do meio Mandels (Mandels e Weber, 1969).

Cloreto de cálcio	0,30 g.L ⁻¹
Cloreto de cobalto	0,20 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	2,00 g.L ⁻¹
Fosfato monobásico de potássio	2,00 g.L ⁻¹
Glicose	*; **
Peptona de soja	5,00 g.L ⁻¹
Sulfato de amônio	1,40 g.L ⁻¹
Sulfato de ferro	0,50 g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio	0,20 g.L ⁻¹
Sulfato de manganês	0,14 g.L ⁻¹
Sulfato de zinco	0,16 g.L ⁻¹
Tween 80	1,00 g.L ⁻¹
Uréia	0,30 g.L ⁻¹

* No preparo do pré-inóculo da FS, a concentração de glicose no meio foi de 30 g.L⁻¹.

** Na produção de extratos e fermentados a concentração de glicose no meio foi de 10 g.L⁻¹.

B – Solução de sulfato de amônio 0,91%

A solução foi preparada segundo Couri e Farias (1995) para a utilização como fonte de nitrogênio para o microrganismo. Nesta, 0,91g de sulfato de amônio foi dissolvido em 1,0 L de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹.

3.2.1.3. Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido foi realizada segundo Gomes (1995) no qual 5,0 g de farelo de trigo foram colocadas em frasco Erlenmeyer de 250 mL e autoclavado a 121,0 °C por 15 min. Após o resfriamento, foi adicionado 3,0 mL de meio de suplementação (solução 0,91% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,1 mol.L⁻¹ ou meio Mandels (Mandels e Weber, 1969)). Os frascos foram inoculados com volume de esporos equivalente a 10⁷ esporos.g⁻¹ de farelo e a mistura homogeneizada e incubada em estufa a 32,0 °C por 72 h. A extração do complexo enzimático foi realizada com a adição ao meio de 50,0 mL de tampão acetato de sódio 50,0 mmol.L⁻¹ pH 4,5 em shaker a 200 rpm, 32,0 °C por 30 min. Em seguida, a mistura foi filtrada, a fase líquida centrifugada a 12.900 g por 10 min sendo o sobrenadante armazenado congelado em freezer a -18,0 °C para posterior utilização.

3.2.1.4. Fermentação submersa (FS)

A produção dos complexos enzimáticos por fermentação submersa também foi realizada segundo Gomes (1995). Este procedimento consistiu de duas etapas. Na primeira, o preparo do pré-inóculo, transferiu-se para um frasco Erlenmeyer de 250 mL 50,0 mL de meio de cultivo (solução 0,91% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,1 mol.L⁻¹ ou meio Mandels e Weber (1969)) contendo 30 g.L⁻¹ de glicose. Adicionou-se o volume de esporos equivalente a 10⁷ esporos.mL⁻¹ de meio de suplementação e a mistura foi homogeneizada e incubada em shaker a 32,0 °C, 200 rpm por 50 h. Na segunda etapa, foi realizada a inoculação na qual 0,5 g de farelo de trigo foi colocado em frasco Erlenmeyer de 250 mL e este foi autoclavado a 121,0 °C por 15 min. Após o resfriamento adicionou-se 40,0 mL de meio de suplementação (solução 0,91% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em HCl 0,1 mol.L⁻¹ ou meio mineral de Mandels e Weber (1969)) contendo glicose 10 g.L⁻¹ e 10,0 mL do pré-inóculo. O conjunto foi incubado em shaker a 200 rpm e 32,0 °C por 72 h. Em seguida, o fermentado foi filtrado, centrifugado a 12.900 g por 10 min e o sobrenadante obtido foi armazenado e congelado para posterior utilização.

3.2.1.5. Análise dos complexos enzimáticos

Os complexos enzimáticos obtidos por FES e FS, amostras e diluições dos diversos ensaios de estabilidade e precipitação foram analisados em termos das atividades enzimáticas FPase, CMCCase e xilanase e concentração de proteínas totais (inclusive as amostras do ensaio de hidrólise de bagaço de cana) em triplicata conforme descrito a seguir.

A quantificação dos açúcares liberados durante as reações enzimáticas das medidas de atividade foi realizada pelo método de DNS (MILLER, 1959). Como esta medida deve levar em consideração a produção de açúcares apenas durante a reação enzimática, preparou-se "brancos reacionais" nos quais foram utilizados os mesmos componentes dos ensaios enzimáticos, porém, com a adição do reagente de DNS imediatamente após a adição do complexo enzimático. Uma unidade de atividade enzimática (UI) corresponde a 1,0 μmol de açúcares redutores liberados por minuto nas condições de reação utilizadas.

A – Atividade enzimática FPase

A atividade enzimática FPase foi realizada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando tiras de papel de filtro Whatman nº 01 medindo 1,0 x 6,0 cm como substrato. A quantificação dos açúcares liberados durante as reações foram realizadas segundo Miller (1959).

B – Atividade enzimática de CMCCase

A medida da atividade celulolítica da endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase, CMCCase) foi realizado segundo a metodologia descrita por Ghose (1987) utilizando solução de CMC 4,0% em tampão citrato de sódio, 50,0 mmol.L^{-1} pH 4,8. A quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação foi realizada segundo Miller (1959).

C – Atividade enzimática de xilanase

A atividade xilanásica dos complexos foi determinada pelo método descrito por Bailey et al. (1992) que utiliza como substrato a solução de xilana 1,0% p/v (1,0 g de xilana dissolvida em

25,0 mL de solução de NaOH 1mol.L^{-1} , seguido de ajuste de pH com HCl $2,0\text{mol.L}^{-1}$ até pH 5,0, completando-se o volume para 50,0 mL com água e adicionando-se 50,0 mL de tampão acetato de sódio $0,2\text{mol L}^{-1}$ pH 5,0. A determinação de açúcares redutores segundo Miller (1959).

D – Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS

A quantificação de açúcares redutores liberados durante as reações enzimáticas foi realizada segundo o método descrito por Miller (1959) utilizando como reagente o 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS). Neste ensaio, os tubos contendo 1,0 mL do reagente DNS acrescidos de 1,0 mL da mistura reacional foram colocados em banho a $100,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Após a fervura os tubos foram colocados em banho de gelo, provocando o abaixamento brusco da temperatura interrompendo a reação. Posteriormente foi realizada a diluição da mistura até 15,0 mL pela adição de água. Em seguida, realizou-se a medida de absorvância a 540 nm. A curva padrão de absorvância em função da concentração de açúcar redutor foi feita utilizando soluções de glicose nas concentrações de 1,0 a $10,0\text{ }\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

E – Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais presentes foi determinada pelo método de Bradford (1976), com sensibilidade até $0,01\text{ mg.mL}^{-1}$ usando BSA (albumina de soro bovino) como referência para a obtenção da curva padrão. O procedimento constituiu em adicionar 100 μL de amostra a 1000 μL de reagente Coomassie Blue e agitar a mistura em vórtex. Após repouso por 10 min, fazia-se a medida de absorvância em 595 nm. A curva padrão de absorvância da concentração de BSA foi feita utilizando soluções de BSA nas concentrações de 0,01 a $0,10\text{ mg.mL}^{-1}$.

3.2.1.6. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelos complexos enzimáticos

O teste de hidrólise de bagaço de cana foi realizado segundo Vitcosque et al. (2012) utilizando bagaço de cana de açúcar *in natura* como substrato. Neste ensaio, 1,5 g de bagaço de

cana foi colocado em frasco Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 30,0 mL de tampão citrato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 4,8. Em seguida, adicionou-se volume de complexo enzimático contendo a carga enzimática de 1 FPU por grama de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. O conjunto foi mantido em shaker a $50,0 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm por 36 h. Ao final da reação a mistura foi filtrada, centrifugada e a fase líquida submetida à quantificação de açúcares redutores liberados pelo método de DNS. Concomitantemente, foi realizado ensaio controle, nas mesmas condições descritas acima sem a adição do complexo enzimático, para a avaliação da liberação de açúcares no meio por solubilização.

3.2.1.7. Eletroforese SDS-PAGE dos complexos enzimáticos

O perfil eletroforético dos complexos enzimáticos foi obtido por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (1970), para as quais foram utilizados géis nas concentrações de 7,5 e 12,5% para marcadores de alta e baixa massa molecular, respectivamente.

3.2.2. Estudo da estabilidade térmica e de pH dos complexos enzimáticos

3.2.2.1. Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos

Os ensaios de estabilidade térmica dos complexos enzimáticos foram realizados para a obtenção de uma faixa de temperatura segura, em termos da manutenção da atividade enzimática, para os estudos de precipitação. Nestes ensaios, 1,0 mL do complexo foi transferido para tubo de ensaio e adicionou-se 1,0 mL de tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0. Os tubos foram incubados em banho termostaticado nas temperaturas de $15,0$; $30,0$ e $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e dois tubos foram retirados a cada tempo de envelhecimento (10, 30, 60, 120 e 180 min). Após incubação, as amostras foram diluídas em tampão citrato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0 e centrifugadas a 12.900 g por 10 min. Em seguida, a fase líquida foi submetida à quantificação da concentração de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase.

3.2.2.2. Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos

Os ensaios de estabilidade de pH dos complexos enzimáticos foram realizados para a obtenção de uma faixa de pH segura, em termos da manutenção da atividade enzimática, para os estudos de precipitação. Nestes ensaios, o ajuste do pH do complexo foi feito pela mistura complexo-tampão na proporção 9:1 na qual a concentração molar do tampão foi $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (dez vezes a concentração molar final desejada), o volume total contido em cada tubo era de 2,0 mL. No ajuste do pH foi utilizado o tampão citrato de sódio para os valores de pH de 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 e tampão fosfato de sódio para os valores de pH de 6,0; 7,0 e 8,0. Os tubos foram incubados em banho termostatizado a $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ com retirada de dois tubos a cada tempo de envelhecimento (30, 60, 120 e 180 min). Após o tempo de incubação, o conteúdo dos tubos foram centrifugados a 12.900 g por 10 min. Em seguida, as fases líquidas foram submetidas à quantificação da concentração de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase.

3.2.3. Estudos de precipitação em tubos de ensaio

Para todas as precipitações descritas a seguir, o volume de complexo enzimático em cada tubo era de 1,0 mL e o volume total dependia da concentração de etanol a ser utilizada. O complexo enzimático teve o seu pH ajustado pela mistura complexo-tampão na proporção 9:1 na qual a concentração molar do tampão foi $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (dez vezes a concentração molar final desejada).

3.2.3.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos com etanol em tubos de ensaio

O ponto de turvação dos complexos enzimáticos durante a adição de etanol foi avaliado para determinar a concentração mínima de etanol capaz de provocar a turvação visual do meio. Nestes ensaios, os tubos contendo 2,0 mL de complexo enzimático foram submetidos à pesagem para a medida da massa inicial. Em seguida, com os tubos sob agitação em banho de gelo o etanol a $-7,0 \text{ }^\circ\text{C}$ foi adicionado gota a gota com a ajuda de uma pipeta automática até a detecção

visual de turvação no meio. Ao atingir o ponto de turvação observável, sendo esta mantida após 10 min, o conjunto foi novamente submetido à pesagem para a determinação da massa de etanol adicionada.

A determinação da concentração percentual final de etanol no meio ($E_{\%}$) capaz de provocar a turvação da mistura foi realizada utilizando as equações:

$$m_E = m_f - m_i \quad (\text{eq. 3.1})$$

$$D_E = m_E / V_E \quad (\text{eq. 3.2})$$

na qual

$$E_{\%} = (V_E / V_t) \times 100 \quad (\text{eq. 3.3})$$

sendo m_E a massa de etanol, m_f a massa final do conjunto, m_i a massa inicial do conjunto, D_E a densidade do etanol a $-7,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,815\text{ g L}^{-1}$), V_E o volume de etanol adicionado, V_t o volume total da mistura e $E_{\%}$ o percentual de etanol (v/v) na mistura.

3.2.3.2. Planejamento experimental fatorial 2^3 para as precipitações com etanol

Nos experimentos de precipitação de xilanases dos complexos enzimáticos com etanol estudou-se o efeito da variação de temperatura, pH e concentração de etanol sobre a concentração de proteínas totais e atividade enzimática de xilanases nos precipitados recuperados. A combinação entre as variáveis, assim como o número de experimentos, foram determinados pelo planejamento experimental fatorial 2^3 , com níveis +1 e -1 e 3 repetições no ponto central (PC, nível zero) (RODRIGUES e IEMMA, 2005), de acordo com a Tabela 3.3, resultando em 11 experimentos.

Tabela 3.3: Planejamento fatorial 2^3 para precipitação em tubo de ensaio.

Variável	Nível (-1)	Ponto central	Nível (+1)
Temperatura (°C)	15,0	30,0	45,0
pH	4,0	5,5	7,0
Etanol (% v/v final)	70	80	90

3.2.3.3. Cinética preliminar de precipitação com etanol

A cinética preliminar de precipitação foi realizada com o intuito de determinar o tempo de incubação (período após o ajuste das condições de precipitação) para os estudos determinados via planejamento experimental nas condições de ponto central. Para isso, inicialmente fez-se o ajuste do pH dos complexos enzimáticos em pH 5,5 segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.3. Em seguida, com os tubos contendo 1,0 mL de complexo enzimático, sob agitação em banho de gelo, o etanol a -7,0 °C foi adicionado gota a gota até atingir a concentração final de 80% v/v de etanol (4,0 mL de etanol). Os tubos foram incubados em banho termostaticado a 30,0 °C e foram retiradas dois tubos por vez a cada tempo de envelhecimento (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 7,0; 10,0 e 24,0 h). Os conteúdos dos tubos foram centrifugados a 12.900 g por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 5,0 mL de tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 e submetido à quantificação da concentração de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase.

3.2.3.4. Estudo da seleção de variáveis na precipitação dos complexos enzimáticos com etanol segundo planejamento experimental fatorial 2^3

Para os experimentos de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol segundo o planejamento experimental fatorial 2^3 , ajustou-se o pH do complexo em 4,0; 5,5 ou 7,0 segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.3. Em seguida, com os tubos sob agitação, em banho de gelo, o etanol a -7,0 °C foi adicionado gota a gota até a concentração de etanol requerida (70, 80 ou 90% v/v). Em seguida, os tubos foram incubados a 15,0; 30,0 ou 45,0 °C por 3 h, sendo

então centrifugados a 12.900 g por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 5,0 mL de tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 e submetido à quantificação de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase.

3.2.3.5. Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2²

Nos ensaios de precipitação com etanol segundo o planejamento experimental composto central 2² dos complexos enzimáticos a temperatura foi fixada em 15,0 °C e o ponto central da concentração de etanol foi elevada para 85% v/v. Assim, estudaram-se os efeitos da variação de pH e da concentração de etanol. A combinação entre as variáveis, assim como o número de experimentos, foram determinados pelo planejamento experimental fatorial 2², com níveis -1,41; -1,00; +1,00; +1,41 e três repetições no ponto central (PC, nível zero) (RODRIGUES e IEMMA, 2005), de acordo com a Tabela 3.4, resultando em 11 experimentos.

Tabela 3.4: Planejamento composto central 2² para precipitação em tubo de ensaio.

Variável	Níveis				
	-1,41	-1,00	0	+1,00	+1,41
pH	3,4	4,0	5,5	7,0	7,6
Etanol (%)	77,9	80,0	85,0	90,0	92,1

Para estes experimentos, ajustou-se o pH do complexo em 3,4; 4,0; 5,5; 7,0 ou 7,6 segundo descrito no primeiro parágrafo do item 3.2.3. Em seguida, com os tubos sob agitação, em banho de gelo, o etanol a -7,0 °C foi adicionado gota a gota até a concentração de etanol requerida (77,9; 80,0; 85,0; 90,0 ou 92,1% v/v). Ao atingir a concentração requerida os tubos foram incubados em banho termostático a 15,0 °C por 3,0 h. Após esta incubação os tubos foram centrifugados a 12.900 g por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado obtido foi dissolvido em 5,0 mL de tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 e submetido à quantificação

da concentração de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase. Para a análise dos dados experimentais foi utilizado o software Statistica (Statsoft, versão 8.0) através do qual foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados a 95% de confiança e a representação gráfica de superfícies de resposta .

3.2.3.6. Estudo cinético de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol baseado nos estudos com planejamento experimental

Para o estudo cinético de precipitação inicialmente ajustou-se o pH do complexo em 5,5 segundo descrito no primeiro parágrafo do item 3.2.3. Em seguida, com os tubos sob agitação, em banho de gelo, o etanol a -7,0 °C foi adicionado gota a gota até a concentração de 85 (% v/v) de etanol. Após esse procedimento, os tubos foram incubados em banho termostaticado a 15,0 °C e retirados em diferentes tempos de envelhecimento (entre 0 a 600 min). Os tubos foram então centrifugados a 12.900 g por 10 min e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 5,0 mL de tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 e submetido à quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica.

3.2.4. Estudos de precipitação do complexo enzimático com etanol em tanque agitado

Em todos os experimentos realizados em tanque agitado, ajustou-se o pH do complexo em 5.5 pela adição de tampão citrato de sódio. Para que a diluição do complexo fosse a menor possível, a concentração do tampão era dez vezes a concentração final requerida (0,2 mol.L⁻¹) e a proporção da mistura era 9:1 entre complexo e tampão.

3.2.4.1. Determinação da solubilidade de proteínas e da solutividade de atividade xilanásica em função da concentração de etanol

Para verificar a variação da solubilidade das proteínas e da solutividade de xilanases presentes no complexo durante o processo de precipitação com diferentes concentrações de

etanol, fez-se o ajuste em pH 5,5 do complexo (segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.4), transferiu-se volume desejado deste (40,0; 35,0; 30,0; 20,0; 15,0 ou 10,0 mL) para o tanque de 100 mL resfriado a 4,0 °C e ajustou-se a agitação em 150 rpm. Em seguida, o etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹ até atingir-se a concentração requerida (60, 65, 70, 80, 85 ou 90%). A retirada de 3,0 mL de amostra foi feita em triplicata em diferentes tempos. As amostras retiradas foram centrifugadas a 12.900 g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado dissolvido em 3,0 mL de tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 para a quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica.

Neste trabalho, definiu-se uma “solubilidade aparente” (*S*) como sendo a porção da concentração de proteína no fermentado que não foi precipitada. Ela foi calculada como a diferença entre a quantidade da proteína presente originalmente na batelada e a quantidade de proteína precipitada ao fim da batelada dividida pelo volume de fermentado, segundo a Equação 3.5:

$$S = \{P_f V_f - [(V_{bat} / V_{amostra}) (P_{ppt} V_{ppt})]\} / V_f \quad (\text{eq. 3.5})$$

na qual:

S = solubilidade aparente (mg.mL⁻¹)

P_f = concentração de proteínas no fermentado (mg.mL⁻¹)

V_f = volume do fermentado na batelada (mL)

V_{bat} = volume da batelada (mL)

V_{amostra} = volume da amostra (mL)

P_{ppt} = concentração de proteínas na solução do precipitado dissolvido (mg.mL⁻¹)

V_{ppt} = volume de solução do precipitado dissolvido (mL)

Chamamos de solutividade (*S_{tv}*) da enzima a atividade volumétrica do fermentado não detectada no precipitado, seja por desnaturação, desativação ou devido à solubilidade da enzima (PINHEIRO et al., 2015). Na mesma linha de definição da solubilidade aparente, a solutividade é a porção da atividade volumétrica do fermentado que não foi recuperada. Ela foi calculada como a diferença entre o número de unidades de atividade presente originalmente na batelada e o

número de unidades de atividade precipitada ao fim da batelada dividida pelo volume de fermentado, segundo a Equação 3.6:

$$S_{iv} = \{A_f V_f - [(V_{bat} / V_{amostra}) (A_{ppt} V_{ppt})]\} / V_f \quad (\text{eq. 3.6})$$

na qual:

S_{iv} = solutividade (UI.mL⁻¹)

A_f = atividade enzimática do fermentado (UI.mL⁻¹)

V_f = volume do fermentado na batelada (mL)

V_{bat} = volume da batelada (mL)

$V_{amostra}$ = volume da amostra (mL)

A_{ppt} = atividade enzimática da solução do precipitado dissolvido (UI.mL⁻¹)

V_{ppt} = volume de solução do precipitado dissolvido (mL)

3.2.4.2. Estudo de precipitação de xilanases em duas etapas

Primeira etapa de precipitação (corte)

Inicialmente, ajustou-se o pH do fermentado em pH 5,5 (segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.4), transferiu-se 35,0 mL deste para o tanque de 100 mL resfriado a 4,0 °C e a agitação foi ajustada em 150 rpm. Em seguida, o etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹ até atingir a concentração de 65% v/v. A mistura foi deixada em agitação por 60 min. Decorrido esse tempo, a mistura foi recolhida e centrifugada a 12.900 g por 10 min. O precipitado foi dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 para a quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica. O sobrenadante foi colocado de volta no tanque para a segunda etapa da precipitação.

Segunda etapa de precipitação

O sobrenadante resultante da primeira etapa de precipitação voltou para o tanque de 100 mL resfriado a 4,0 °C e a agitação foi ajustada em 150 rpm. O etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹ até à concentração final de 90% (v/v). Após a adição de etanol, a mistura foi deixada sob agitação por 15 min. Decorrido esse tempo a mistura foi recolhida, centrifugada a 12.900 g por 10 min e o precipitado dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0 para a quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica.

3.2.5. Precipitação com uso de semente

3.2.5.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos durante a adição de etanol em tanque agitado

Para determinar a concentração mínima de etanol capaz de provocar a turvação visual do meio, ajustou-se o pH dos complexos em 5,5 (segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.4) e transferiu-se 40,0 mL deste para o tanque de 100 mL resfriado a 4,0 °C com agitação de 150 rpm. Em seguida, o etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Inicialmente adicionou-se etanol até a concentração alcançar 43% v/v (concentração arbitrária tomada com base nos dados de ponto de turvação obtidos nos experimentos em tubo de ensaio); a partir desse ponto, a adição foi feita de modo que a concentração fosse aumentada em 1% com intervalos de 5,0 min, tempo suficiente para a homogeneização do meio e a observação visual. Esse procedimento foi repetido até que a turvação do meio fosse observada visualmente e se mantivesse constante durante 5,0 min. Registrava-se então o volume de etanol adicionado e calculava-se a sua concentração final. Esses experimentos foram realizados para a determinação do ponto da concentração de etanol na qual a semente deveria ser adicionada ao meio.

3.2.5.2. Produção da semente 1

Para a produção da semente 1 (Figura 3.2), ajustou-se do pH do fermentado em pH 5,5 (segundo descrição no primeiro parágrafo do item 3.2.4), transferiu-se 10,0 mL deste para o tanque de 100 mL resfriado a 4,0 °C e a agitação foi ajustada em 150 rpm. Em seguida, o etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹ até atingir a concentração final de 90% (v/v). A mistura foi deixada sob agitação por 60 min. Decorrido esse tempo a mistura foi recolhida, centrifugada a 12.900 g por 10 min. O precipitado foi submetido à liofilização dando origem à semente 1. A semente foi submetida à quantificação da concentração de proteínas totais e da atividade enzimática de xilanase.

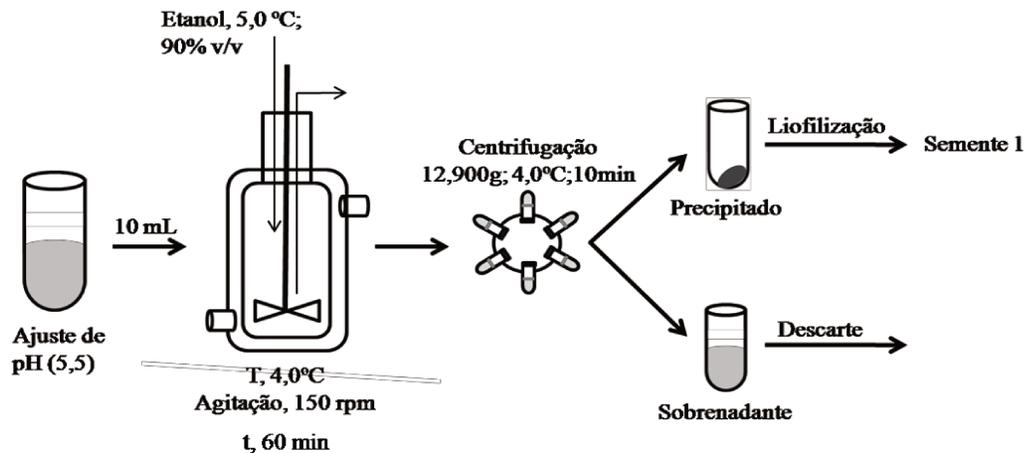


Figura 3.2: Desenho esquemático que descreve o processo de produção da semente 1.

3.2.5.3. Precipitação com a presença de 1,5% de semente 1

Para a precipitação dos fermentados com o uso de semente (Figura 3.3), ajustou-se o pH do fermentado em pH 5,5 (item 3.2.4), transferiu-se 35,0 mL deste para o reator de 100 mL resfriado a 4,0 °C e a agitação foi ajustada em 150 rpm. Em seguida, o etanol a 5,0 °C foi adicionado gota a gota através da bomba dosadora na vazão de 2,0 mL.min⁻¹ até atingir a concentração de 51% v/v (ponto de turvação). A mistura foi deixada sob agitação por 5 min. Após esse tempo, adicionou-se a massa de sólidos contendo proteína equivalente a 1,5% da proteína contida no fermentado a

ser precipitado. O etanol foi novamente gotejado até atingir a concentração de 60% (v/v). O conjunto foi deixado em agitação por 5 min e então foram retiradas três amostras de 5,0 mL. Em seguida, elevou-se novamente a concentração de etanol até à nova concentração. Esse procedimento se repetiu para todas as concentrações sugeridas (60, 65, 70, 80, 85 e 90% v/v). As amostras recolhidas foram centrifugadas a 12.900 g por 10 min e o precipitado submetido à quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica. Para esses estudos foi realizada uma precipitação controle, a qual seguiu-se a mesma sequencia experimental descrita acima, porém, sem a adição da massa de sólidos, ou seja, sem a presença da semente no meio.

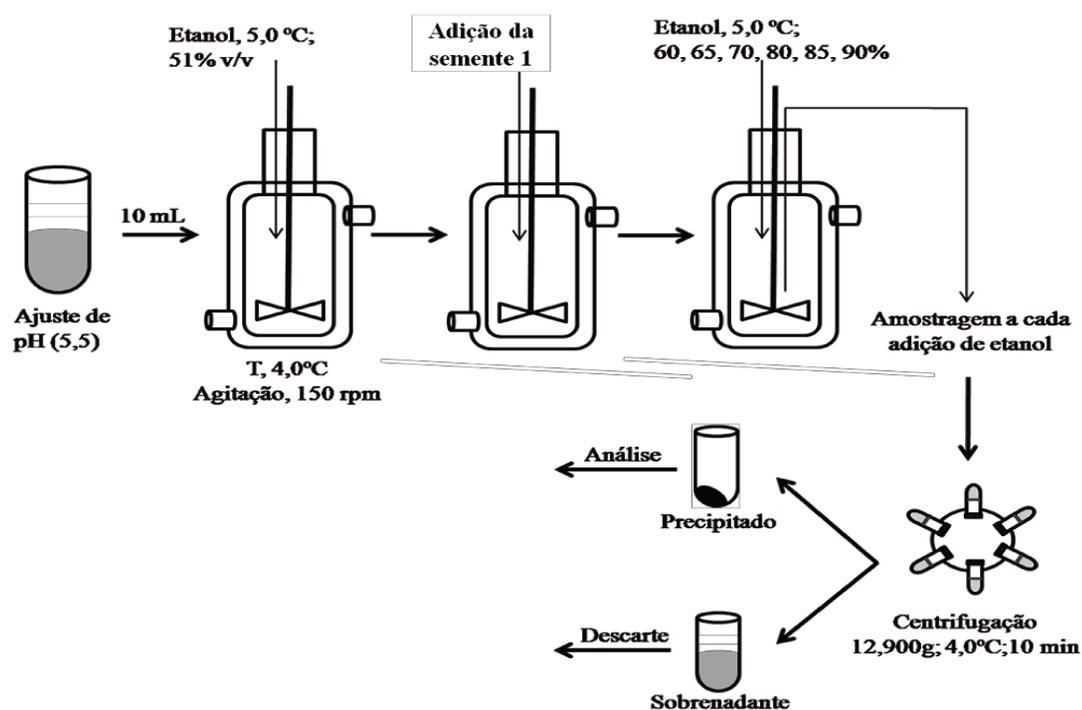


Figura 3.3: Desenho esquemático do processo de precipitação com a utilização de semente 1.

3.2.5.4. Precipitação com a presença de 3,0% de semente 1

Estes experimentos com 3% de semente foram realizados segundo a metodologia descrita no item 3.2.5.2, porém a semente adicionada foi a massa de sólido liofilizado contendo proteína equivalente a 3,0% da proteína contida no fermentado a ser precipitado.

3.2.5.5. Precipitação com adição de 1,5% de semente 1 abaixo do ponto de turvação

Este experimento seguiu os passos descritos no item 3.2.5.2 tendo como único diferencial, a concentração de etanol no momento da adição da semente. Esta ocorreu quando a concentração de etanol atingiu 48% v/v, ou seja, concentração de etanol abaixo do ponto de turvação.

3.2.5.6. Preparação da semente 2

Ao final do processo descrito no item 3.2.5.4, o volume da mistura contendo 90% de etanol que ainda se encontrava no tanque foi recolhido, centrifugado a 12.900 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à liofilização. Aos sólidos resultantes desse processo chamamos de semente 2. Este sólido foi submetido à quantificação de proteínas totais e da atividade xilanásica e em seguida foi armazenado para posterior utilização.

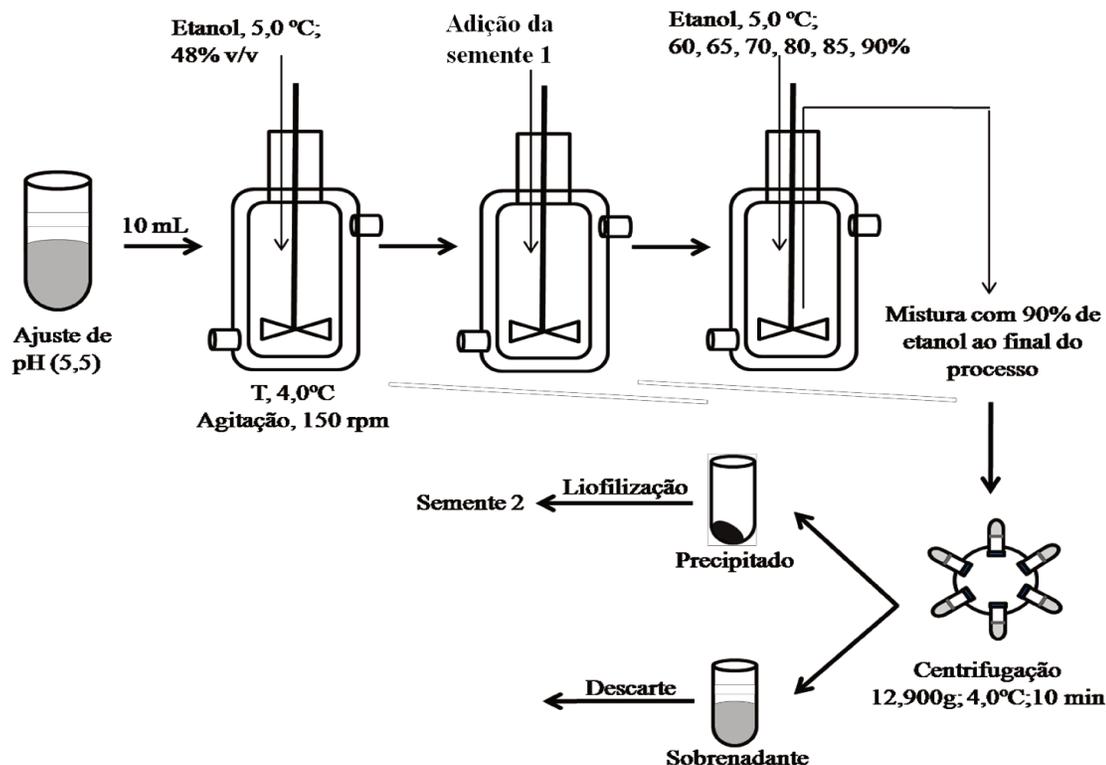


Figura 3.4: Desenho esquemático que descreve o processo de produção da semente 2.

3.2.5.7. Precipitação com a presença de 1,5% de semente 2

Este experimento seguiu os passos descritos no item 3.2.5.4, porém, a semente adicionada ao meio foi a massa de sólidos obtidos no item 3.2.5.5, a qual chamamos de semente 2.

3.2.5.8. Precipitação utilizando BSA como semente

Este experimento seguiu os passos descritos no item 3.2.5.4, porém a semente adicionada ao meio foi a massa de sólidos de citrato de sódio e BSA (proporção mássica de citrato:BSA de 99,47 : 0,53), na qual, a massa de BSA presente era equivalente a 1,5% da proteína total presente no fermentado a ser precipitado.

Para todos os experimentos com a utilização de semente, foi realizado o calculo de efetividade da semente para os quais utilizou-se a Equação 3.7.

$$\eta = 1 - (S_{ivs} / S_{ivc}) . \quad (\text{eq. 3.7})$$

sendo η a efetividade da semente, S_{ivs} a solutividade de xilanases com o uso de semente e S_{ivc} a solutividade de xilanase sem o uso de semente (controle).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Escolha do meio de suplementação para FES e nutriente para FS adequado para a produção de enzimas por *A. niger*

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de selecionar entre o meio Mandels e a solução de sulfato de amônio aquele que seria mais adequado tanto para a fermentação no estado sólido (FES) quanto para a fermentação submersa (FS) com vista na maior produção de enzimas pelo fungo *A. niger* nos dois sistemas. Os resultados desses experimentos são apresentados na Tabela 4.1 e na Figura 4.1.

Tabela 4.1: Caracterização enzimática dos complexos produzidos por *A. niger* em FES e FS.

Sistema e meio de cultivo	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	FPase (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	CMCase (UI.mL ⁻¹)	AR (μmol.mL ⁻¹)
1 - FES e Mandels	0,23 ± 0,02	0,05 ± 4,3x10 ⁻³	4,19 ± 0,32	0,82 ± 0,07	4,47 ± 0,40
2 - FES e (NH ₄) ₂ SO ₄	0,21 ± 0,02	0,05 ± 3,5x10 ⁻³	4,01 ± 0,28	0,62 ± 0,06	3,24 ± 0,26
3 - FS e Mandels	0,09 ± 7,2x10 ⁻³	0,02 ± 1,6x10 ⁻³	1,05 ± 0,06	0,45 ± 0,04	5,05 ± 0,47
4 - FS e (NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 ± 4,5x10 ⁻³	0,05 ± 3,8x10 ⁻³	0,83 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,46 ± 0,04

AR = concentração de açúcares redutores após a hidrólise de bagaço de cana. Experimentos em triplicata, desvios padrão máximos: proteína, 10,1%; FPase, 8,6%; xilanase, 7,7%; CMCase, 9,2%; e AR, 9,3%.

As análises realizadas nos complexos obtidos por FES e FS mostraram diferenças entre estes. O teor de proteína nos complexos enzimáticos produzidos em FES foi superior ao produzido em FS, independentemente do meio de suplementação ou nutriente utilizado. Sugere-se que por tratar-se de um fungo filamentosos, o sistema de FES mimetiza o seu habitat natural favorecendo o melhor desenvolvimento deste, refletindo em uma maior produção de proteínas.

Quando comparamos os meios utilizados para a suplementação e nutriente ou o tipo de cultivo em termos de atividade enzimática observou-se que os complexos produzidos por FES e FS utilizando o meio Mandels apresentaram atividades enzimáticas maiores que os seus correspondentes nos quais foi utilizada a solução de sulfato de amônio, exceto no caso da FPase de FS na qual o complexo enzimático produzido em solução de sulfato de amônio apresentou maior atividade. No entanto, os complexos enzimáticos produzidos utilizando o meio Mandels mostraram-se mais eficientes quanto à hidrólise de bagaço de cana, sendo que o complexo obtido por FS foi o que apresentou melhor resultado ($5,05 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, de açúcar redutor liberado). Sugere-se que um melhor balanceamento entre as atividades enzimáticas deste complexo pode ter facilitado a atividade sinérgica refletindo na sua eficiência em degradar o substrato sólido. Comportamento oposto ocorreu com o complexo obtido por FS utilizando a solução de sulfato de amônio que, apesar das atividades específicas de FPase e CMCase relativamente maiores, apresentou o menor valor de concentração de açúcar redutor liberado durante a hidrólise dentre os complexos enzimáticos testados.

Na eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.1) é possível observar a diferença de conteúdo proteico nos cultivos FES e FS. No caso do cultivo FS, nota-se diferenças nos perfis proteicos dos cultivos com diferentes meios de suplementações e nutriente, mesmo com a baixa concentração de proteínas nesses fermentados. Bandas de cerca de 16 e 30 kDa (Figura 1a) são fortes para o cultivo no qual foi utilizado o meio Mandels e não estão presentes no caso da utilização da solução de sulfato de amônio (estas bandas também não são visualizadas nas pistas referentes aos cultivos FES). Ainda para o cultivo realizado em FS, vê-se uma banda entre 14 – 20 kDa para o caso do uso de solução de sulfato de amônio que não foi detectada no cultivo utilizando o meio Mandels.

Os resultados desses experimentos mostraram o meio descrito por Mandels e Weber (1969) (aqui chamado apenas de Mandels) como sendo o mais adequado para a utilização tanto como meio de suplementação em FES como meio nutriente em FS para a produção por *A. niger*, das enzimas aqui estudadas, principalmente de xilanases, razão pela qual selecionou-se este meio para os cultivos que visaram a produção destes complexos.

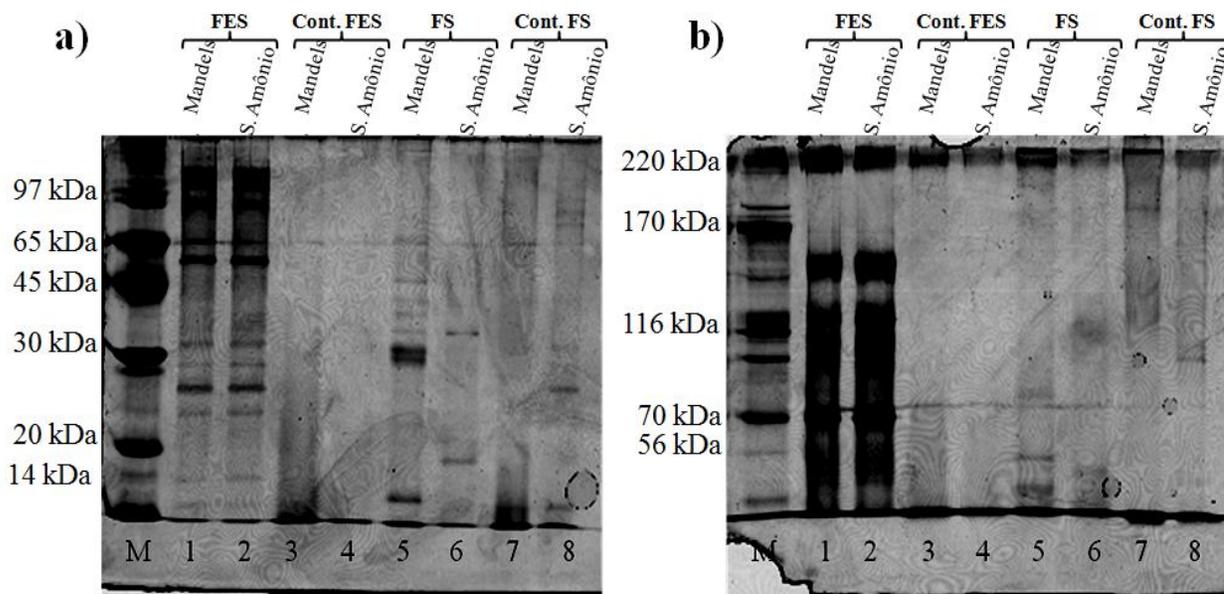


Figura 4.1: SDS-PAGE dos complexos de FES e FS de *A. niger*. Géis: (a) 12,5% e (b) 7,5% de acrilamida. Pistas: (1) FES com meio Mandels; (2) FES com solução de sulfato de amônio; (3) controle com meio Mandels; (4) controle com solução de sulfato de amônio; (5) FS com meio Mandels; (6) FS com solução de sulfato de amônio; (7) controle com meio Mandels; (8) controle com solução de sulfato de amônio. (M) marcadores de (a) baixas e (b) altas massas moleculares. Carga de proteína: 1,5 µg/pista.

4.2. Estudo da estabilidade térmica e de pH dos complexos enzimáticos

4.2.1. Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos

Os ensaios de estabilidade térmica dos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e FS foram realizados para a obtenção de uma faixa de temperatura segura, do ponto de vista de manutenção da atividade enzimática, para os estudos de precipitação subsequentes. Os dados obtidos para cada temperatura estudada foram submetidos ao ajuste linear (gráficos não mostrados) de atividade residual em função do tempo para a análise. A desnaturação provocaria uma diminuição da atividade com o tempo e possivelmente uma diminuição da concentração de proteína solúvel devido à precipitação de proteína desnaturada. Os resultados do ajuste linear dos dados destes experimentos são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Estabilidade térmica dos complexos enzimáticos da FES e da FS de *A. niger* a pH 5,0 por 3 h: valores do ajuste linear dos resultados da variação da concentração de proteínas ou atividade xilanásica com o tempo.

Temperatura (°C)	Xilanase			Proteínas			
	Ativ ₀	a _{ativ} (10 ⁻³)	R ²	Prot ₀	a _{prot} (10 ⁻⁵)	R ²	
FES	15,0	6,50	2,6	0,970	0,23	1,0	0,983
	30,0	6,84	2,1	0,975	0,22	20,0	0,880
	45,0	6,90	-1,1	0,984	0,22	2,0	0,964
FS	15,0	6,22	-1,2	0,980	0,07	-4,0	0,957
	30,0	6,34	-1,1	0,983	0,05	8,0	0,931
	45,0	6,39	1,3	0,977	0,05	10,0	0,906

$Ativ|_t = Ativ|_0 + a_{ativ}t$ e $Prot|_t = Prot|_0 + a_{prot}t$. $Ativ|_0$, coeficiente linear; a_{ativ} , coeficiente angular; R^2 , coeficiente de correlação. Experimentos realizados a pH 5,0 por 3 h, em duplicata, com amplitudes máximas: atividade xilanásica FES, 0,96 UI.mL⁻¹; atividade xilanásica FS, 0,35 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas FES, 0,05 mg.mL⁻¹; concentração de proteína FS, 0,01 mg.mL⁻¹.

Os resultados mostraram não haver variação significativa na atividade xilanásica e nem na concentração de proteínas, entre os complexos enzimáticos de FES e de FS, visto as inclinações das retas ajustadas aos pontos para concentração de proteínas (a_{prot}) e atividade xilanásica (a_{ativ}) em função do tempo serem pequenas levando a variações de no máximo $0,2 \times 10^{-2}$ mg.mL⁻¹ e 0,2 UI.mL⁻¹ respectivamente em 3 h (180 min). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos nos trabalhos de Guimarães et al. (2013), Chipeta et al. (2005), Bakri et al. (2010) e Betini et al. (2009) (Tabela 2.3), nos quais foi estuda a estabilidade térmica de xilanases de diferentes fungos.

4.2.2. Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos

Os ensaios de estabilidade de pH dos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e FS foram realizados para a obtenção de uma faixa de pH segura, do ponto de vista de manutenção da atividade enzimática, para os estudos de precipitação subsequentes. Os dados

obtidos para cada valor de pH estudado foram submetidos ao ajuste linear (gráficos não mostrados) para a análise (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Estabilidade de pH dos complexos enzimáticos da FES e da FS de *A. niger* a 30 °C por 3 h: valores do ajuste linear dos resultados da variação da concentração de proteína ou atividade xilanásica com o tempo.

pH	Xilanase			Proteínas			
	Ativ ₀	a _{ativ} (10 ⁻³)	R ²	Prot ₀	a _{prot} (10 ⁻⁵)	R ²	
FES	3,0 ¹	8,78	3,6	0,911	0,16	9,0	0,790
	4,0 ¹	9,09	-4,2	0,821	0,21	-2,0	0,964
	5,0 ¹	7,61	4,6	0,917	0,24	-20,0	0,931
	6,0 ¹	9,29	5,8	0,95	0,24	-10,0	0,918
	6,0 ²	9,65	0,8	0,972	0,25	-5,0	0,988
	7,0 ²	9,32	-3,3	0,967	0,25	-10,0	0,945
	8,0 ²	8,94	-1,0	0,909	0,25	-4,0	0,930
	FS	3,0 ¹	7,67	-0,6	0,861	0,06	0,7
4,0 ¹		8,96	-4,6	0,841	0,07	3,0	0,890
5,0 ¹		6,93	8,3	0,971	0,08	-9,0	0,897
6,0 ¹		8,72	6,6	0,898	0,08	-6,0	0,949
6,0 ²		8,58	0,8	0,895	0,08	1,0	0,970
7,0 ²		8,67	-1,7	0,967	0,09	-3,0	0,937
8,0 ²		8,17	-2,7	0,926	0,10	-5,0	0,929

Ativ_t = Ativ₀ + a_{ativ}t e Prot_t = Prot₀ + a_{prot}t. Ajuste de pH: ¹Tampão citrato de sódio, ²tampão fosfato de sódio por 3 h. Ativ₀, coeficiente linear; a_{ativ}, coeficiente angular; R², coeficiente de correlação. Experimentos realizados em duplicata com amplitudes máximas: atividade xilanásica FES, 0,94 UI.mL⁻¹; atividade xilanásica FS, 0,77 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas FES, 0,03 mg.mL⁻¹; concentração de proteína FS, 0,01 mg.mL⁻¹.

Os resultados dos experimentos a diferentes valores de pH, durante 3 h (180 min), apresentados na Tabela 4.3 mostraram que não houve variação significativa tanto na atividade xilanásica quanto na concentração de proteínas nos complexos enzimáticos de FES e de FS. Neste estudo, as maiores variações foram da mesma ordem daquelas encontradas para o estudo de

estabilidade térmica. Nos experimentos realizados em pH 6,0 com diferentes tampões (citrato de sódio e fosfato de sódio) também não apresentaram grandes variações em função da mudança do tampão, sendo as variações máximas da atividade de xilanase $0,36 \text{ UI.mL}^{-1}$ em FES e $0,15 \text{ UI.mL}^{-1}$ em FS. Por outro lado, para a concentração de proteínas a variação em FES foi de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ enquanto que em FS não houve variação. Estes resultados corroboram com os de outros trabalhos relacionados à estabilidade de xilanases fúngicas a diferentes valores de pH (Tabela 2.4).

Assim, como a concentração de proteínas e a atividade xilanásica tanto dos complexos enzimáticos produzidos em FES quanto em FS mostraram-se relativamente estáveis em relação às variações de temperatura e pH nas faixas estudadas, para a continuidade dos estudos de precipitação de xilanases utilizando etanol como agente precipitante, definiu-se as seguintes faixas operacionais para a continuação deste trabalho: temperatura entre $15,0$ e $45,0$ °C e pH de $3,0$ a $8,0$.

4.3. Estudos de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol

Muitos autores têm relatado diferenças entre as enzimas com atividade xilanólítica produzidas por microrganismos em FES e FS (FREDERICK et al., 1985; MATSUSHIDA et al., 1985; KORMELINK et al., 1993; BENEDETTI et al., 2013; AHMAD et al., 2013). Ao mesmo tempo, a precipitação de xilanases com etanol, apesar de bastante conhecida, ainda apresenta algumas limitações tais como baixos rendimentos e a necessidade de altas concentrações do precipitante no processo. Assim, os estudos de precipitação com etanol dos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e FS, feitos de maneira comparativa, visaram a detecção dessas possíveis diferenças entre esses complexos frente ao processo de precipitação. Além disso, os experimentos realizados via planejamento experimental com a variação de parâmetros operacionais de temperatura, pH e concentração de etanol buscaram uma condição de recuperação eficiente de xilanases presentes nesses complexos enzimáticos.

4.3.1. Determinação do ponto de turvação dos complexos enzimáticos com etanol em tubos de ensaio

A determinação do ponto de turvação foi realizada para a verificação da concentração mínima de etanol capaz de provocar a turvação visual dos complexos enzimáticos. A turvação dos complexos é um indicativo da presença de fase sólida no meio à uma determinada condição. Os ensaios foram conduzidos adicionando-se etanol a $-7,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, gota a gota, aos complexos enzimáticos contidos em tubos de ensaios sob agitação até a detecção visual de turvação no meio.

Os resultados obtidos (média de dez repetições) mostraram comportamentos diferentes para os complexos enzimáticos produzidos em FES e em FS quanto à concentração de etanol mínima para a detecção visível de turvação no meio. Os complexos de FES necessitaram de $50,8 \pm 0,13\%$ (v/v) de etanol enquanto os complexos de FS precisaram em média da concentração de $56,2 \pm 0,97\%$ (v/v) para atingir o mesmo ponto. Esta diferença, apesar de relativamente pequena, pode ser consequência da maior concentração de proteínas no meio FES ($0,244\text{ mg.mL}^{-1}$ de FES contra $0,111\text{ mg.mL}^{-1}$ de FS). Segundo Nakadai e Nasuno (1989) uma maior concentração de proteína no meio favorece a formação de partículas à uma menor concentração de etanol devido a possível maior supersaturação e taxas de nucleação e crescimento altas.

4.3.2. Cinética preliminar de precipitação com etanol

A cinética de precipitação preliminar foi realizada para a determinação do tempo de incubação nos estudos de precipitação via planejamento experimental fatorial 2^3 . Os experimentos foram feitos nas condições de ponto central do planejamento experimental (item 3.2.3.2) com a retirada de amostras em diferentes tempos de incubação.

Os resultados da cinética preliminar de precipitação de proteínas totais e de xilanases dos complexos enzimáticos de FES e de FS (Figura 4.2) mostraram comportamentos parecidos para FES e FS quanto à variação na recuperação de proteínas e atividade de xilanase com o tempo, ou seja, percentuais altos de recuperação em tempos curtos seguido de queda de ambas com o passar do tempo. A queda da atividade de xilanase recuperada pode ser consequência da desnaturação decorrente da exposição da enzima à alta concentração de etanol por tempo prolongado.

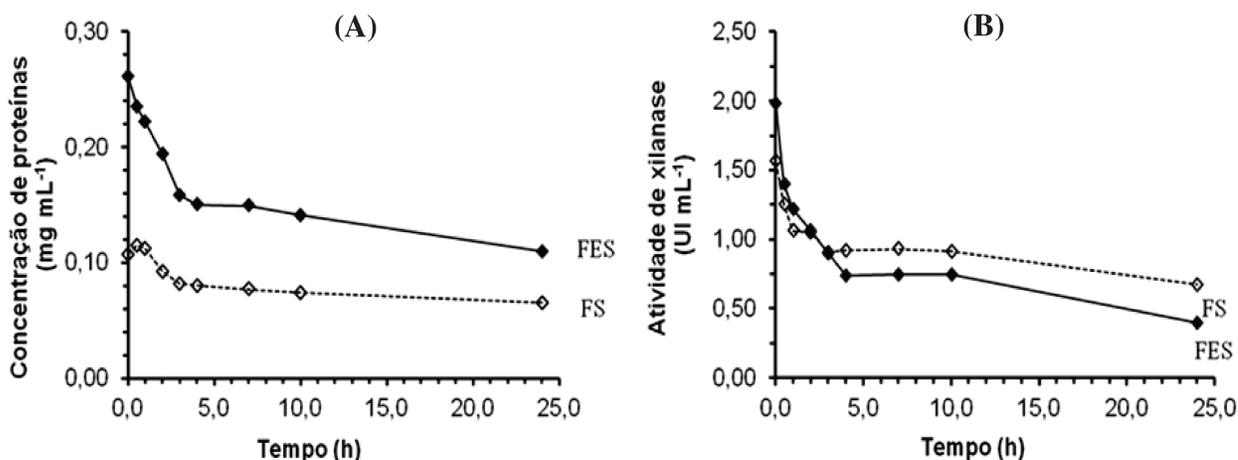


Figura 4.2: Cinética preliminar de precipitação de (A) proteínas e (B) xilanases dos fermentados de FES e fermentados de FS com etanol. Temperatura 30,0 °C; pH 5,5; concentração de etanol 80% v/v.

Nos trabalhos de precipitação de xilanases com etanol, diferentes tempos de precipitação têm sido utilizados. Cortez e Pessoa Jr. (1999), Fadel et al. (2014) e Mariño et al. (2015) utilizaram precipitações em tempos curtos de no máximo 30 min, enquanto que no trabalho de Farinas et al. (2011) o tempo para a precipitação foi de 3 h. Neste trabalho, com base nos dados obtidos na cinética preliminar de precipitação determinou-se o tempo de 3 h para os estudos de precipitação com etanol segundo o planejamento experimental fatorial 2^3 . Tempo no qual a perda de atividade enzimática ainda não é acentuada.

4.3.3. Estudo da seleção de variáveis na precipitação dos complexos enzimáticos com etanol segundo planejamento experimental fatorial 2^3

Os resultados obtidos nos experimentos de precipitação dos fermentados de FES e FS produzidos por *A. niger* utilizando etanol como agente precipitante, visando a seleção de variáveis que teriam efeito sobre o processo de precipitação, pelo delineamento experimental fatorial 2^3 , são apresentados na Tabela 4.4. Utilizando o software Statistica (Statsoft, versão 8.0) foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis estudadas, assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases e proteínas totais.

Tabela 4.4: Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental fatorial 2³: análise da atividade de xilanase e da concentração de proteínas dos complexos enzimáticos após a precipitação.

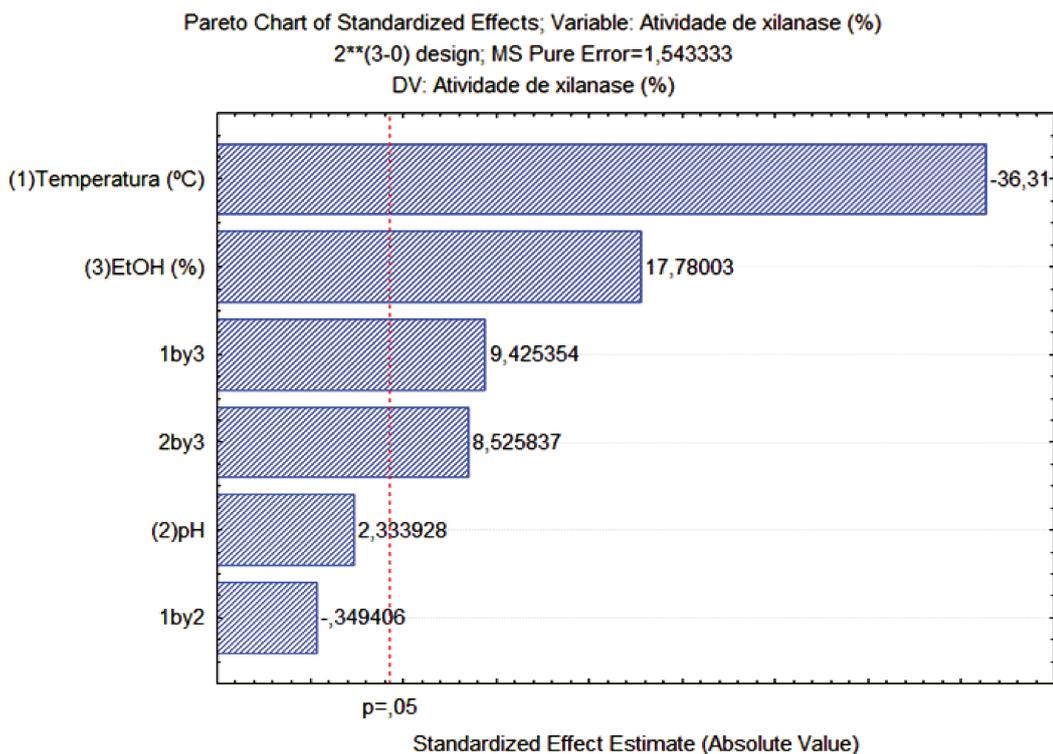
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Concentração de etanol v/v (%)	FES				FS			
				X _R (%)	P _R (%)	A _E (UI.mg ⁻¹)	F _P	X _R (%)	P _R (%)	A _E (UI.mg ⁻¹)	F _P
1	15,0	4,0	70	35,1	39,3	20,40	0,94	9,4	86,0	5,83	0,11
2	45,0	4,0	70	2,2	28,8	3,31	0,15	0,8	14,2	3,27	0,06
3	15,0	7,0	70	35,1	51,4	1,65	0,08	35,9	19,7	99,19	1,87
4	45,0	7,0	70	1,9	12,7	19,47	0,90	53,4	47,6	59,46	1,19
5	15,0	4,0	90	39,8	52,2	16,64	0,77	77,4	54,0	75,98	1,43
6	45,0	4,0	90	22,9	63,7	14,91	0,69	12,2	36,7	17,68	0,33
7	15,0	7,0	90	54,3	70,7	16,82	0,76	52,3	64,8	43,28	0,81
8	45,0	7,0	90	26,6	28,4	7,86	0,36	0,1	6,6	1,14	0,02
9	30,0	5,5	80	46,4	40,8	24,85	1,15	55,8	48,0	62,17	1,17
10	30,0	5,5	80	46,3	42,4	24,47	1,13	54,2	49,3	58,17	1,09
11	30,0	5,5	80	44,2	40,9	23,63	1,09	57,7	45,2	68,27	1,28

X_R, atividade de xilanase recuperada; P_R, proteína recuperada; A_E, atividade enzimática específica (atividade enzimática por grama de proteína); F_P, fator de purificação. Referência: FES – atividade de xilanase inicial, 7,28 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,34 mg.mL⁻¹; atividade específica de xilanase inicial, 21,69 UI.mg⁻¹. FS – atividade de xilanase inicial, 5,79 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,11 mg.mL⁻¹; atividade específica de xilanase inicial, 53,16 UI.mg⁻¹.

Os gráficos de Pareto (Figura 4.3 e 4.4) também foram analisados em termos da recuperação de proteínas totais e da atividade xilanásica nos precipitados pela variação da temperatura, pH e concentração de etanol.

Os resultados obtidos para a precipitação dos complexos enzimáticos de FES e FS (Tabela 4.4) mostraram que na condição de ponto central (30,0 °C; pH 5,5; 80% v/v etanol) precipita-se proteínas totais e xilanases praticamente nas mesmas proporções, sendo que nas precipitações de FS esses valores percentuais de recuperação tanto de xilanases quanto de proteínas totais são mais elevados. Nos experimentos realizados a 45,0 °C houve a diminuição na recuperação de proteínas e atividade xilanásica tanto para FES quanto para FS, exceto no ensaio 4 para FS (pH 7,0; 70% v/v etanol) no qual os resultados foram parecidos com aquele obtidos no ponto central (ensaio 9, 10 e 11). Com a variação da temperatura, é observado um efeito negativo desta sobre a recuperação da atividade xilanásica e de proteínas totais as quais diminuem com o aumento da temperatura. Para a atividade xilanásica, a diminuição percentual da recuperação nessas condições pode ser consequência da desnaturação irreversível provocada pelo aumento da temperatura do sistema resultante da mistura etanol-solução aquosa, que já era alta (15,0 a 45,0 °C) (TSCHELIOESSNIG et al., 2014; COHN et al., 1946; OSS, 1989; SOARES et al., 2012). Além disso, solventes orgânicos são desestabilizadores de proteínas e podem desnatura-las quando utilizados em altas concentrações ou altas temperaturas devido as suas favoráveis interações com grupos hidrofóbicos (INOUE e TIMASHEFF, 1972; ARAKAWA et al., 2007). Por outro lado, a elevação da temperatura pode aumentar a solubilidade de algumas proteínas diminuindo a concentração de proteínas totais no precipitado. Assim, é de se esperar que o aumento dessas duas variáveis ao mesmo tempo cause um efeito de desnaturação ainda maior às proteínas. Nas precipitações em pH 4,0, os melhores resultados de recuperação de proteínas e atividade xilanásica tanto em FES quanto em FS foram obtidos no ensaio 5 (15 °C; 90% v/v etanol). O diferencial nesse caso foi que em FES precipitou-se, percentualmente, mais proteínas totais do que xilanases, enquanto que em FS o resultado foi inverso. Esses resultados refletiram diretamente na diferença de fator de purificação: FES, 0,77; FS, 1,43. Ainda nas precipitações a pH 4,0, no ensaio 1 (15 °C, 70% v/v etanol), em FES as recuperações percentuais de proteínas e xilanases ativas foram próximas: 39,3 e 35,1%, respectivamente. Por outro lado, na FS houve uma diferença bastante acentuada entre as recuperações de proteínas totais e xilanases ativas (86,0 e 9,4%, respectivamente).

a)



b)

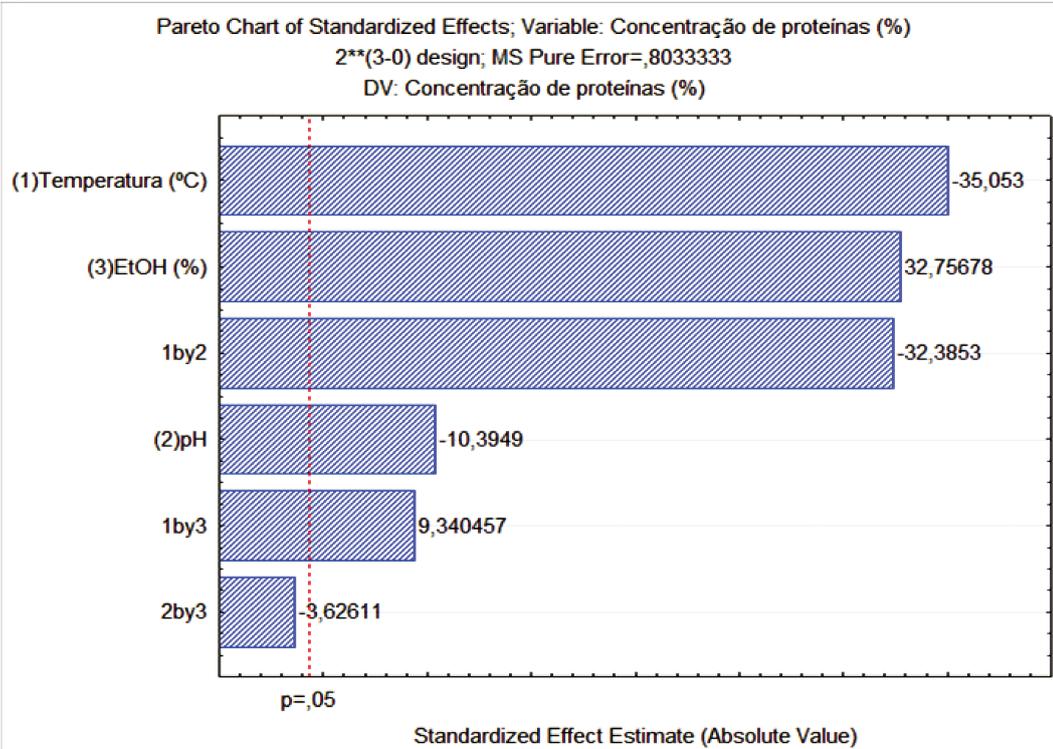
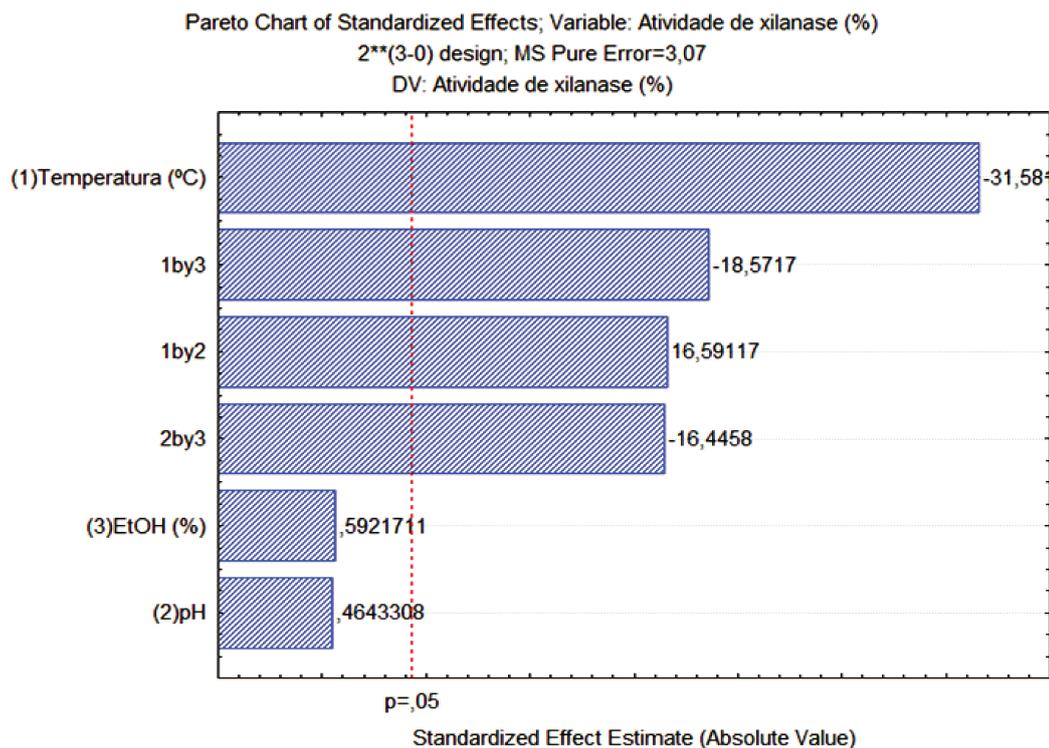


Figura 4.3: Gráficos de Pareto dos efeitos da temperatura, pH e concentração de etanol assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FES.

a)



b)

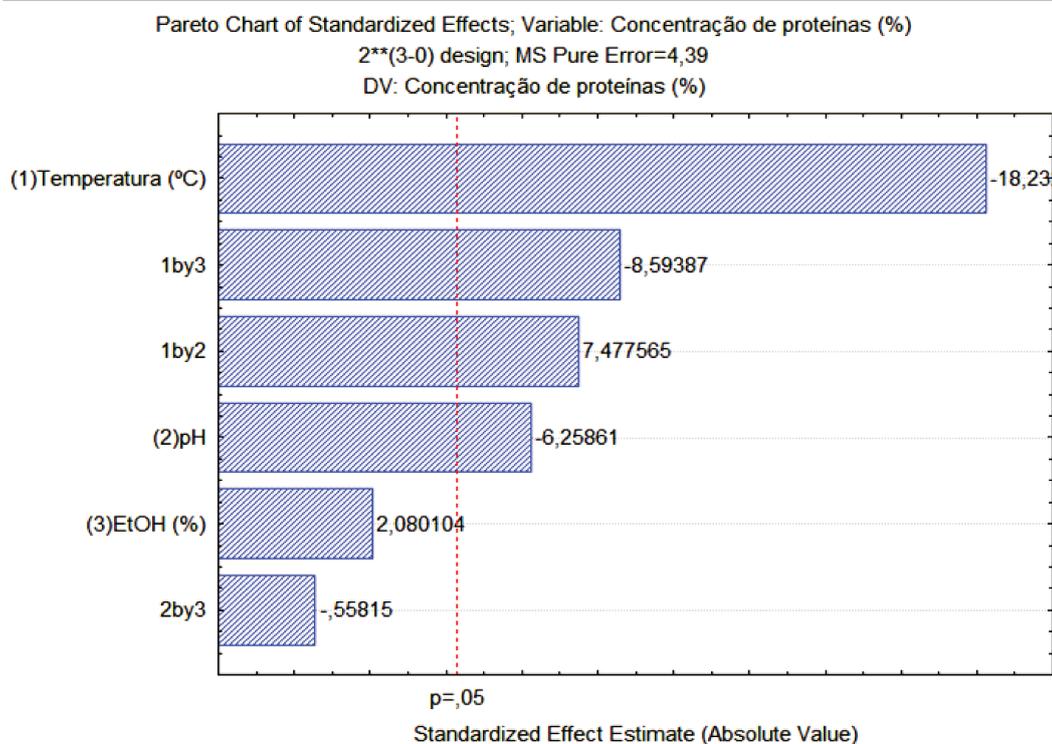


Figura 4.4: Gráficos de Pareto dos efeitos da temperatura, pH e concentração de etanol assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FS.

Segundo os gráficos de Pareto (Figura 4.3a e 4.3b), para os complexos enzimáticos de FES, a 95% de confiança as variáveis temperatura e concentração de etanol tiveram efeitos estatisticamente significativos sobre a atividade xilanásica, com a temperatura apresentando efeito negativo. Além disso, as interações temperatura-concentração de etanol e pH-concentração de etanol também tiveram efeitos estatisticamente a 95% de confiança (Figura 4.3a). Na concentração de proteínas (Figura 4.3b), os maiores efeitos são atribuídos à temperatura, concentração de etanol e à interação temperatura-pH. O efeito individual do pH, assim como da interação temperatura-concentração de etanol, também foram registrados, porém, com menor intensidade quando comparado aos outros. Para a precipitação dos complexos enzimáticos produzidos em FS (Figura 4.4a), a 95% de confiança, são significativos o efeito individual de temperatura e os efeitos das interações temperatura-concentração de etanol, temperatura-pH e pH-concentração de etanol. Para recuperação de proteínas totais (Figura 4.4b), as variáveis temperatura e pH apresentaram efeitos significativos além dos efeitos de interação temperatura-concentração de etanol e temperatura-pH.

Os complexos enzimáticos de FES e FS reagiram de maneiras diferentes à variação de temperatura, pH e concentração de etanol, no processo de precipitação com etanol. Como para a recuperação de proteínas e atividade de xilanase tanto de FES quanto de FS o efeito da temperatura foi negativo e em alguns casos a concentração de etanol e o pH não demonstraram significância estatística a 95% de confiança, principalmente para a recuperação de xilanases, foco deste trabalho, como observado nos experimentos com FS, além da não definição de uma condição ótima de precipitação, houve a necessidade da realização de experimentos de precipitações por um planejamento experimental composto central 2^2 . Através deste planejamento de experimentos de segunda ordem é possível estimar, além dos efeitos principais lineares e todos os efeitos de interação dois a dois, todos os efeitos quadráticos principais. A inserção dos pontos axiais deste tipo de planejamento permite a observação, se houver, de curvatura no plano, ou seja, a determinação de pontos ótimos na superfície de resposta. Para este novo estudo de precipitação, a temperatura, que apresentou efeito negativo sobre a recuperação tanto da atividade xilanásica quanto de proteínas totais, foi fixada no seu nível -1 (15,0 °C). A concentração de etanol não teve efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança para a faixa de valores estudados, porém, observou-se maiores recuperações de xilanases e proteínas totais quando a concentração de etanol foi elevada. Por isso, o ponto central da concentração de etanol foi elevado de 80 para 85% v/v.

4.3.4. Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2²

Os resultados obtidos nos experimentos de precipitação dos complexos enzimáticos de por *A. niger* segundo o planejamento experimental composto central 2² são apresentados na Tabela 4.5. Para a análise dos dados obtidos foi utilizado o software Statistica (Statsoft, versão 8.0), este software permitiu a análise dos efeitos das variáveis estudadas assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases e proteínas totais que foram realizadas segundo os gráficos de Pareto (Figura 4.5), a análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.6) e a representação gráfica de superfícies de resposta (Figura 5.6). Os resultados obtidos nas precipitações com etanol segundo o planejamento experimental composto central 2² (Tabela 4.5) mostraram valores percentuais de recuperação de proteínas nos precipitados dos complexos enzimáticos produzidos em FES maiores do que os de FS. Estes resultados podem estar relacionados à maior concentração inicial de proteínas no meio obtido por FES (0,29 mg.mL⁻¹) uma vez que maior concentração inicial de proteínas no meio sugere uma maior supersaturação resultando em maior precipitação percentual destas (NAKADAI e NASUNO, 1989).

O mesmo raciocínio pode ser estendido para a atividade xilanásica, para qual as maiores recuperações foram obtidas nos precipitados do complexo enzimático de FS que inicialmente continham maior atividade xilanásica (7,09 UI.mL⁻¹) em relação aos complexos produzidos em FES (5,16 UI.mL⁻¹). Os complexos enzimáticos de FES e de FS apresentaram diferentes atividades xilanásicas específicas, tanto iniciais (17,79 e 59,08 UI.mg⁻¹ para FES e FS, respectivamente) quanto nos precipitados, resultando em diferentes fatores de purificação. Os fatores de purificação, na maioria dos experimentos, estão abaixo de um, ou seja, nessas condições são precipitadas mais proteínas totais do que xilanases. Estes resultados abrem a possibilidade da utilização do método de precipitação em etapas, uma vez que os valores indicam que concentrações de etanol mais baixas podem resultar em uma condição de corte eficiente.

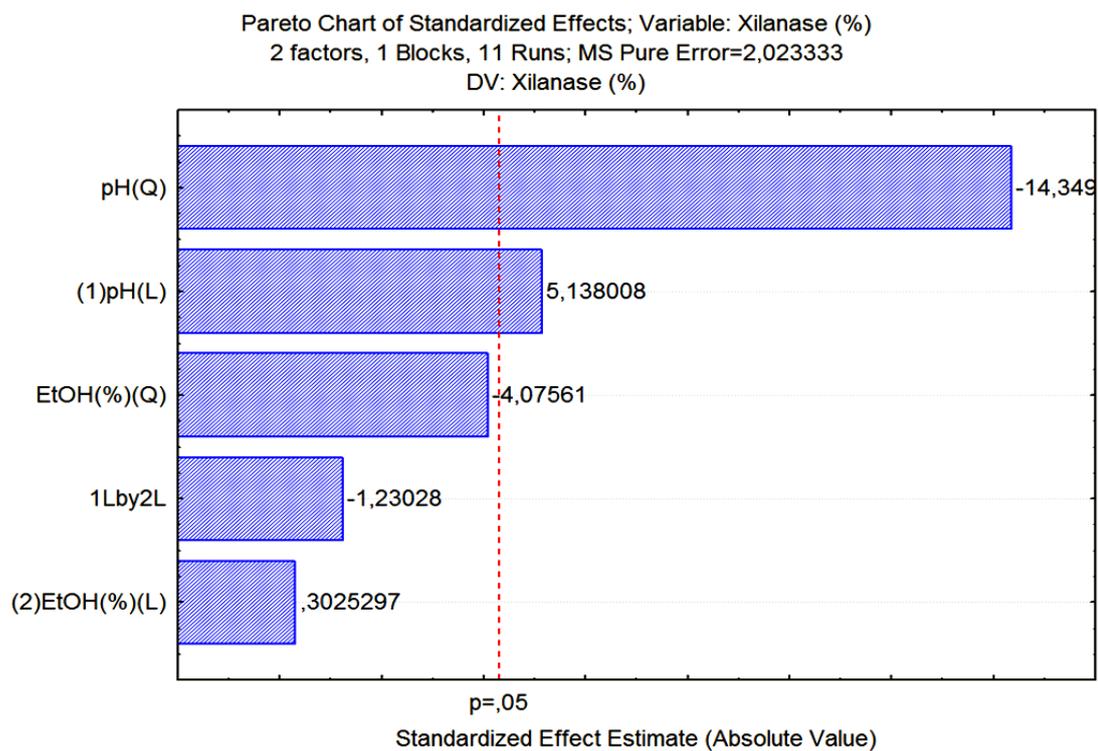
Complexos enzimáticos de FES e de FS têm comportamentos diferentes quanto à recuperação de proteínas totais e de atividade xilanásica na precipitação com etanol. Para os complexos obtidos por FES os melhores resultados de recuperação de proteínas (entre 78,9 e 86,2%) e atividade xilanásica (entre 59,8 e 64,4%) foram obtidos nos ensaios em que o pH inicial foi ajustado no ponto central (5,5), independente da concentração de etanol utilizada.

Tabela 4.5: Precipitação dos complexos enzimáticos com etanol pelo planejamento experimental composto central 2²: análise da atividade de xilanase e da concentração de proteínas dos complexos enzimáticos de FES e de FS.

Ensaio	pH	Concentração de etanol v/v (%)	FES				FS			
			X _R (%)	P _R (%)	A _E (UI.mg ⁻¹)	F _P	X _R (%)	P _R (%)	A _E (UI.mg ⁻¹)	F _P
1	4,0	80,0	42,6	59,4	14,9	0,83	54,2	54,6	27,3	0,46
2	4,0	90,0	45,1	63,0	14,8	0,83	54,6	68,3	53,4	0,90
3	7,0	80,0	56,1	83,0	14,0	0,78	65,4	61,0	51,1	0,86
4	7,0	90,0	55,1	76,4	15,0	0,84	55,9	76,5	48,9	0,83
5	3,4	85,0	48,6	45,1	22,4	1,25	58,3	46,3	40,7	0,69
6	7,6	85,0	46,6	69,8	13,8	0,77	51,9	51,1	60,0	1,02
7	5,5	77,9	60,0	78,9	15,8	0,88	57,8	63,3	60,3	1,02
8	5,5	92,1	59,8	85,6	14,5	0,81	73,5	85,3	46,0	0,78
9	5,5	85,0	62,1	81,4	15,8	0,88	65,8	72,1	48,7	0,82
10	5,5	85,0	64,4	86,2	14,9	0,83	68,7	76,9	47,7	0,80
11	5,5	85,0	61,8	82,7	15,6	0,87	66,4	73,4	48,3	0,82

X_R = atividade de xilanase recuperada, P_R = concentração de proteína recuperada, A_E = atividade específica de xilanase no precipitado, F_P fator de purificação. Referência FES: atividade de xilanase inicial, 5,16 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,29 mg.mL⁻¹; atividade específica de xilanase inicial, 17,79 UI.mg⁻¹. Referência FS: atividade de xilanase inicial, 7,09 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,12 mg.mL⁻¹; atividade específica de xilanase inicial, 59,08 UI.mg⁻¹.

a)



b)

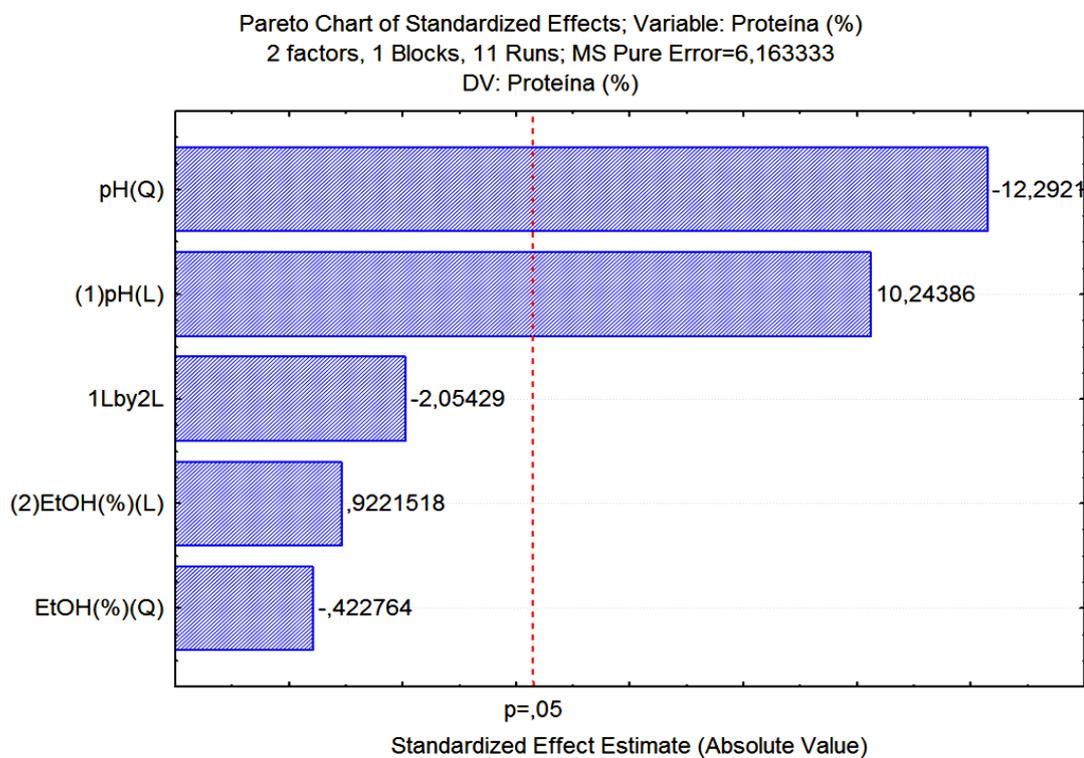
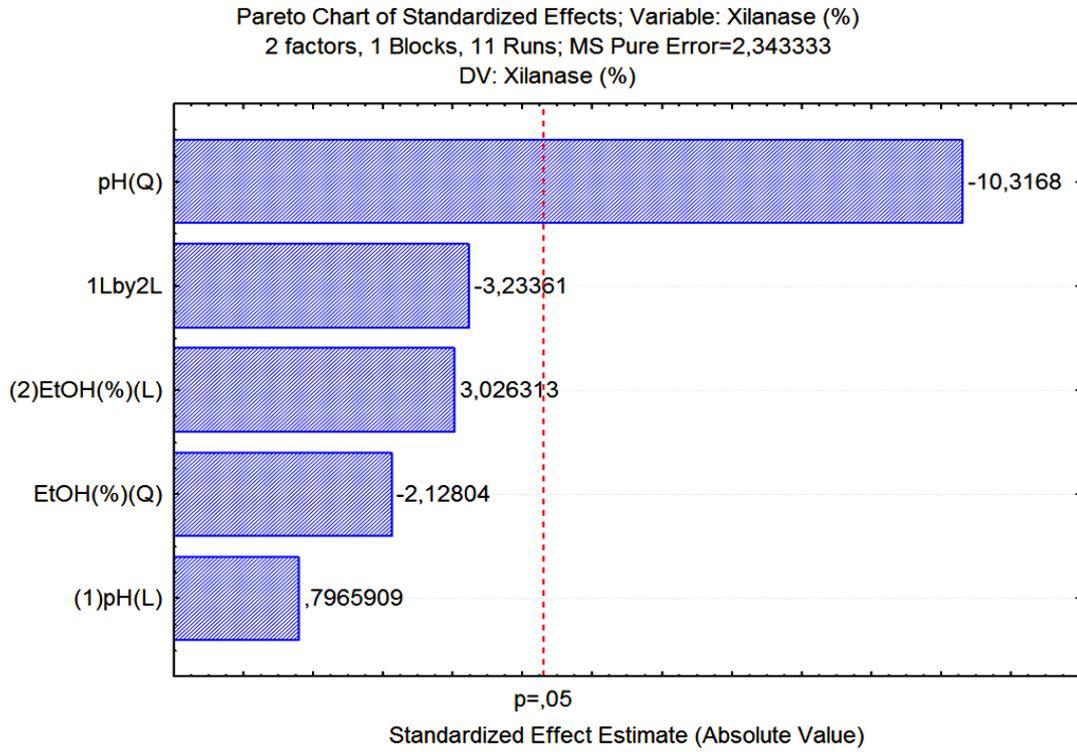


Figura 4.5: Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas (pH e concentração de etanol) assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FES.

a)



b)

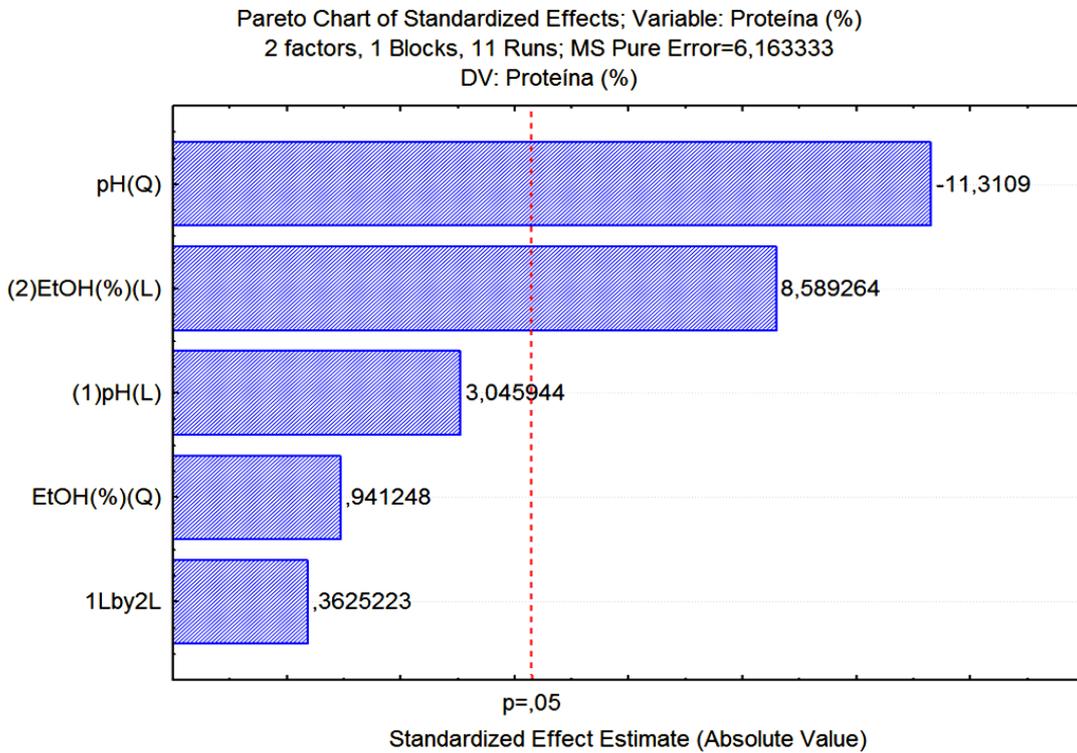


Figura 4.6: Gráficos de Pareto dos efeitos das variáveis estudadas (pH e concentração de etanol) assim como as suas interações sobre a precipitação de xilanases (a) e proteínas totais (b) presentes nos complexos enzimáticos de FS.

Nos complexos enzimáticos produzidos em FS com o pH ajustado em 5,5, a mudança concentração de etanol do nível -1,41 (77,9% v/v) para +1,41 (92,1% v/v) proporcionou um aumento de 16,0% na recuperação de proteínas totais e de 22,0% na recuperação da atividade xilanásica.

Os gráficos de Pareto mostram os efeitos individuais e de interação das variáveis sobre a precipitação de xilanases e proteínas totais dos complexos. Os resultados das precipitações de xilanases e proteínas totais presentes nos complexos enzimáticos produzidos em FES (Figura 4.5) mostram que a 95% de confiança apenas o pH tem efeito (linear e quadrático) estatisticamente significativo tanto sobre a atividade de xilanase (Figura 4.5a) quanto para a concentração de proteínas (Figura 4.5b).

No caso dos complexos enzimáticos produzidos em FS (Figura 4.6), para a precipitação de xilanases apenas o efeito quadrático de pH tem significância, enquanto que para proteínas totais tanto o efeito quadrático de pH quanto o efeito linear da concentração de etanol são estatisticamente significativos.

A Tabela 4.6 apresenta os coeficientes do modelo matemático e parâmetros estatísticos obtidos pela análise da recuperação de proteínas totais e atividade xilanásica após a precipitação de etanol dos complexos enzimáticos de FES e FS.

A análise dos dados permitiu definir o grau de significância de cada variável e a sua interação. Para FES, apenas os efeitos do pH foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as recuperações de proteínas totais e de xilanases ativas. Para a recuperação de proteínas totais de FS o efeito quadrático do pH, bem como o efeito linear da concentração de etanol, foram significativos ao limite de confiança de 95% (valor de $p < 0,05$). Quanto à recuperação xilanases ativas nas precipitações utilizando fermentado de FS, apenas o efeito quadrático de pH foi significativo dentro da faixa avaliada. Em geral, o efeito do pH foi maior do que o efeito da concentração de etanol, tal como pode ser verificado para os valores do coeficiente de listados na Tabela 4.6.

A análise dos coeficientes dos valores da recuperação de proteínas totais e da atividade xilanásica mostrou que o coeficiente de correlação e o teste F foram satisfatórios para a previsão dos modelos utilizados para descrever os gráficos de superfície de resposta dados para a concentração de proteínas totais e atividade xilanásica como uma função do pH e concentração de etanol (Figura 4.7).

Tabela 4.6: Coeficiente de valores e análise estatística para a concentração de proteína total e atividade de xilanase.

	FES				FS			
	Concentração de proteínas totais		Atividade xilanásica		Concentração de proteínas totais		Atividade xilanásica	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
Média	83.43*	0.000	66.30*	0.000	74.13*	0.000	66.97*	0.000
pH	8.99*	0.009	2.58*	0.036	2.67	0.093	0.43	0.509
pH ²	-12.84*	0.007	-8.59*	0.005	-11.82*	0.008	-6.65*	0.009
Etanol	0.81	0.454	0.15	0.791	7.54*	0.013	1.64	0.094
Etanol ²	-0.44	0.714	-2.44	0.055	0.98	0.446	-1.37	0.167
pH.EtOH	-2.55	0.176	-0.88	0.344	0.45	0.752	-2.48	0.084
R	0.98		0.79		0.98		0.60	
F value	50.77		3.83		30.72		1.48	
F _{cal} /F _{listed}	10.05		0.76		6.08		0.29	

R, coeficiente de determinação

*Significância ao nível de 0,05

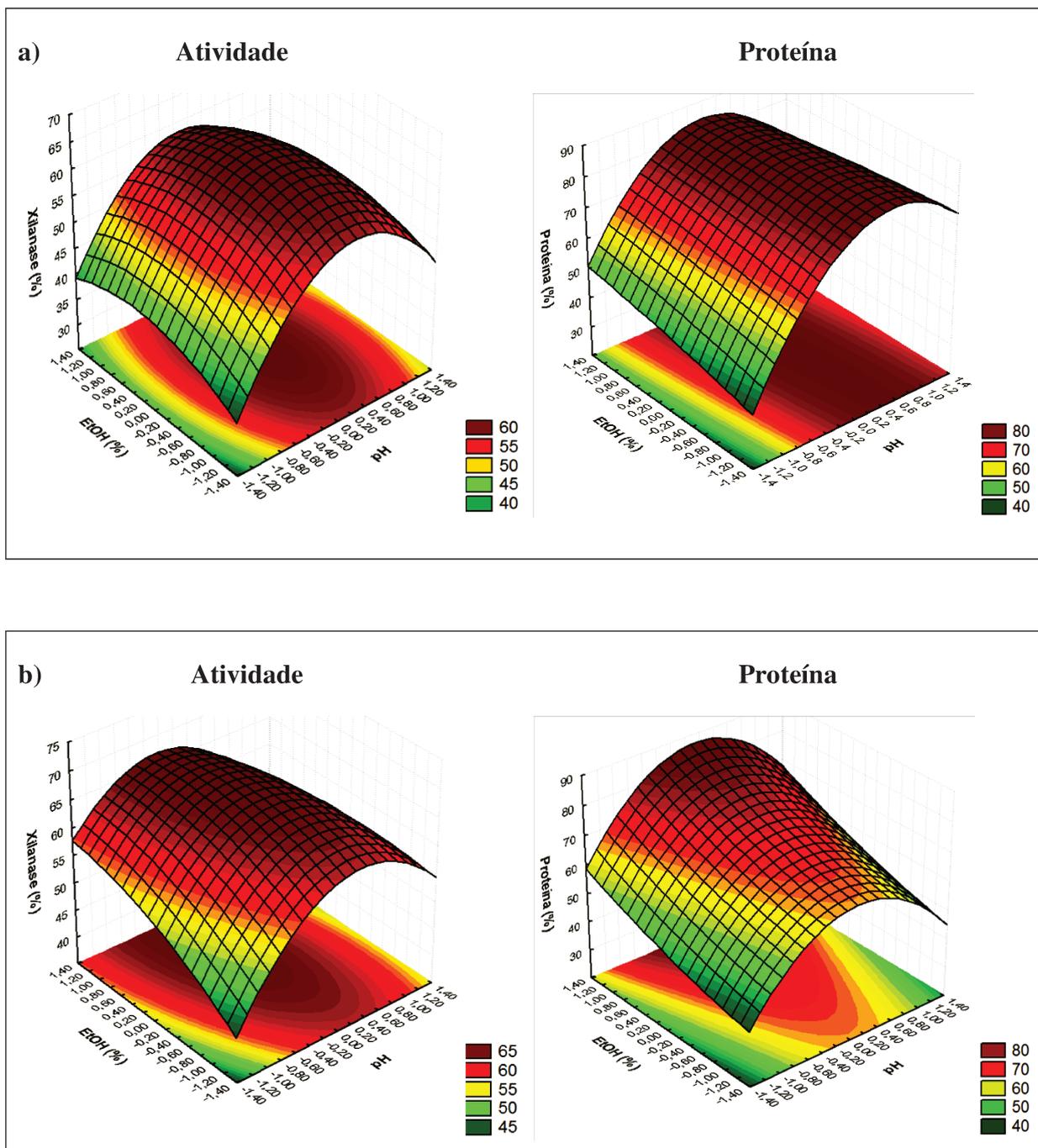


Figura 4.7: Gráficos de superfícies de resposta da precipitação dos complexos enzimáticos de *A. niger* com etanol pela variação da concentração de etanol e do pH inicial do meio. **a)** recuperação de atividade de xilanase e de proteínas em FES, **b)** recuperação da atividade de xilanase e de proteínas em FS.

Os gráficos de superfícies de resposta mostram que para a precipitação com etanol dos complexos enzimáticos produzidos em FES (Figura 4.7a) a melhor recuperação tanto da atividade xilanásica quanto de proteínas totais acontece quando o pH inicial do complexo está entre o ponto central (5,5) e o pH neutro. Nestas condições a influência da concentração de etanol é quase imperceptível sendo melhor notada quando a precipitação foi realizada com o ajuste do pH a valores mais baixos.

Para a precipitação de complexos enzimáticos de FS (Figura 4.7b), os gráficos de superfície de resposta mostram que, tanto para a atividade xilanásica quanto para proteínas totais, as melhores recuperações acontecem com o pH ajustado ao ponto central (5,5). Porém, diferente da FES, para a FS a concentração do precipitante afeta o processo de precipitação de proteínas totais em qualquer valor de pH. Esta influência é mais acentuada quando o ajuste de pH dos fermentados é feito a valores baixos. Por outro lado, a recuperação de atividade xilanásica sofre o efeito da concentração do precipitante apenas a baixos valores de pH.

Os valores obtidos nos experimentos de precipitação dos complexos produzidos por *A. niger* em FES e em FS, segundo este planejamento experimental composto central 2², nas condições definidas como ponto central (concentração de etanol de 85% v/v e pH 5,5) estão próximos dos melhores resultados encontrados para precipitação de xilanases com etanol tanto em FES quanto em FS, razão pela qual estas condições foram adotadas para a realização do estudo cinético.

4.3.5. Estudo cinético de precipitação dos complexos enzimáticos com etanol baseado nos estudos com planejamento experimental

Os resultados do perfil cinético de precipitação com etanol para FES e FS são mostrados na Tabela 4.7 e nas Figuras 4.8 e 4.9.

A Tabela 4.7 mostra que para a recuperação percentual da atividade xilanásica no complexo enzimático de FES o melhor resultado foi de 66,0% obtido nos tempos de 60 e 75 min, enquanto para a precipitação dos complexos de FS, os dados mostraram como melhores resultados a recuperação de 80 a 88,0% da atividade xilanásica inicial do fermentado, obtidos entre 360 e 420 min. Entretanto, em termos de produtividade, para estes sistemas, tempos de precipitação acima de 15 min não são interessantes uma vez que os ganhos, em termos de recuperação da atividade xilanásica, são muito baixos em relação ao tempo gasto.

Tabela 4.7: Cinética de precipitação dos complexos enzimáticos de FES e de FS com etanol.

Tempo (min)	FES			FS		
	P _R (%)	X _R (%)	F _P	P _R (%)	X _R (%)	F _P
0	73,8	62,1	0,84	70,5	79,2	1,12
15	73,8	65,2	0,88	71,6	78,6	1,10
30	77,2	63,4	0,82	76,0	77,1	1,01
45	84,5	64,1	0,76	78,5	78,3	1,00
60	88,9	66,0	0,74	79,5	78,6	0,99
75	90,8	66,0	0,73	79,1	78,2	0,99
90	88,8	62,8	0,71	79,4	76,2	0,96
105	88,1	63,1	0,72	79,3	79,4	1,00
120	88,4	64,1	0,73	79,5	78,7	0,98
150	88,0	61,7	0,70	80,2	79,0	0,98
180	91,0	61,6	0,68	80,6	78,0	0,98
210	91,6	61,5	0,67	79,6	78,8	0,99
240	90,4	63,7	0,70	79,8	75,9	0,94
270	90,4	61,0	0,67	80,5	75,3	0,92
300	88,1	63,5	0,72	82,2	76,2	0,91
330	86,7	63,5	0,73	83,4	79,8	0,93
360	88,9	61,4	0,69	86,1	80,8	0,92
390	87,1	50,9	0,58	88,1	82,7	0,94
420	89,1	50,2	0,56	87,9	88,4	1,03
480	95,6	50,4	0,54	85,7	72,9	0,84
540	95,6	52,6	0,55	86,8	68,7	0,79
600	96,8	52,7	0,54	86,4	69,0	0,80

Experimentos realizados em duplicata com amplitudes máximas para: FES, xilanase = 7,7% e concentração de proteínas = 9,8%. FS, xilanase = 6,9% e concentração de proteínas = 6,7%. Referência: FES, atividade xilanásica inicial = 7,68 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial = 0,23 mg.mL⁻¹. FS, atividade xilanásica inicial = 4,15 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial = 0,12 mg.mL⁻¹. P_R, concentração de proteínas recuperada; X_R, atividade de xilanase recuperada; F_P, fator de purificação da xilanase. Condições de precipitação: temperatura 15,0°C; pH 5,5; concentração de etanol final de 85% v/v. Adição de etanol a -7,0°C.

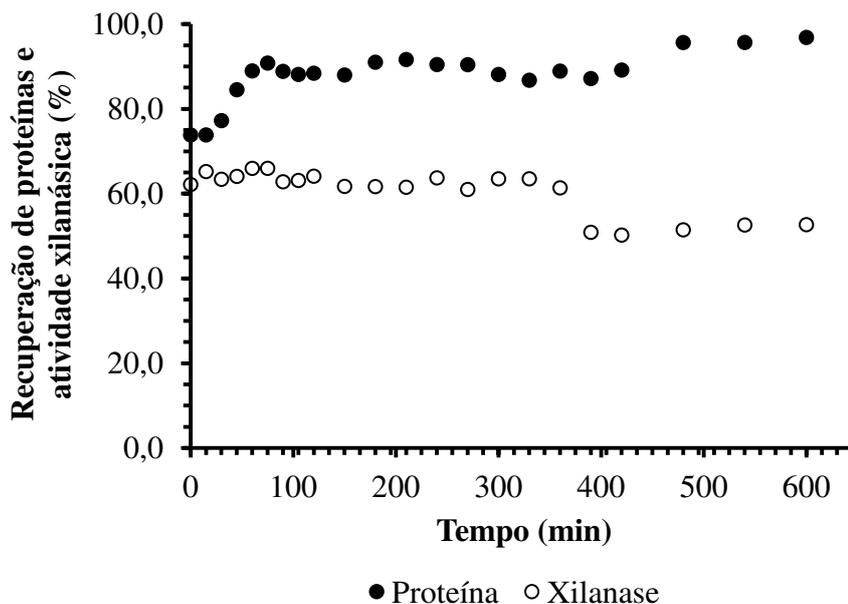


Figura 4.8: Cinética de precipitação com etanol de complexos enzimáticos de *A. niger* produzidos em FES. Médias de duplicatas. Amplitudes máximas: 7,7% para atividade de xilanase e 9,8% para concentração de proteínas. Atividade xilanásica inicial, 4,15 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,23 mg.mL⁻¹. Condições de precipitação: temperatura de incubação 15°C; pH 5,5; concentração de etanol final, 85%. Adição de etanol a -7,0°C.

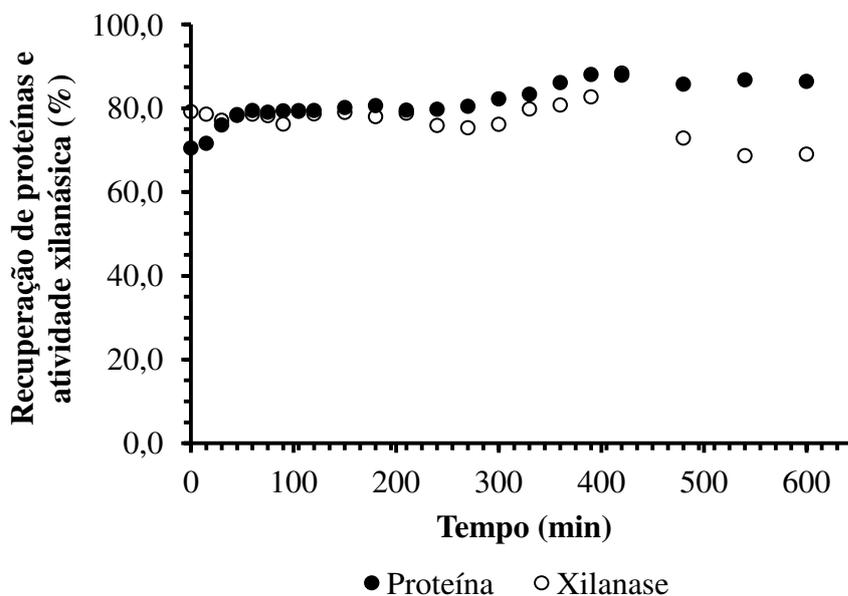


Figura 4.9: Cinética de precipitação com etanol de complexos enzimáticos de *A. niger* produzidos em FS. Médias de duplicatas. Amplitudes máximas: 6,7% para atividade de xilanase e 6,7% para concentração de proteínas. Atividade xilanásica inicial, 7,68 UI.mL⁻¹; concentração de proteínas inicial, 0,12 mg.mL⁻¹. Condições de precipitação: temperatura de incubação 15°C; pH 5,5; concentração de etanol final, 85%. Adição de etanol a -7,0°C.

A diferença na concentração de proteínas inicial e na atividade xilanásica inicial dos complexos de FES e de FS refletiram nas diferentes atividades enzimáticas específicas. Do mesmo modo, diferentes valores de concentração de proteínas e atividade xilanásica nos precipitados resultaram em diferentes fatores de purificação nos precipitados obtidos em diferentes tempos de incubação: para a FES o valor máximo fator de purificação obtido foi de 0,88 a 15 min e para a FS o maior valor registrado foi 1,12 imediatamente após a adição do precipitante (Tabela 4.7). Tanto para FES quanto para FS os maiores valores de fator de purificação são encontrados em tempos curtos de precipitação quando grande parte da proteína total ainda encontra-se solúvel. Estes resultados também mostram que tempos curtos foram suficientes para a recuperação de quase toda xilanase possível de ser precipitada sob essas condições.

O comportamento cinético da precipitação com etanol dos complexos produzidos por *A. niger* em FES (Figura 4.8) mostra o aumento da concentração de proteínas nos precipitados obtidos em tempos curtos (menores que 100 min) atingindo 90% da proteína total inicial em 75 min. Esse valor de recuperação segue praticamente estável até o final do processo. Por outro lado, a atividade de xilanase recuperada se mantém estável desde o início, em torno de 60% da atividade inicial, nos precipitados coletados em até 360 min. A partir desse ponto, ocorre diminuição que pode ser consequência da desnaturação das enzimas pela exposição à alta concentração de etanol por um tempo prolongado.

Na precipitação dos complexos de FS (Figura 4.9) a concentração de proteínas nos precipitados aumentou durante os 45 min iniciais e se manteve estável até 270 min. Em seguida, iniciou novo aumento que perdurou até 360 min. A partir deste ponto a concentração de proteínas manteve-se estável até o final do processo. Já a atividade de xilanase recuperada nos precipitados foi estável desde o início, em torno de 80%, até 360 min. Em seguida, aumentou até atingir 88% em 420 min, ponto a partir do qual a recuperação de atividade nos precipitados começou a diminuir.

A Tabela 4.8 apresenta os dados comparativos do presente trabalho com os relatados por outros autores para a precipitação de xilanases produzidas em FES. O melhor resultado apresentado neste trabalho é superior àqueles obtidos por Farinas et al. (2011) na precipitação de xilanases de *A. niger* com etanol, no qual 23,0% da atividade enzimática foi recuperada com a concentração de 80% v/v de etanol a 10,0 °C por 3 h; quando o precipitante utilizado foi o sulfato de amônio, recuperou-se 27,0% da atividade xilanásica.

Tabela 4.8: Comparativo de dados de precipitação de xilanases produzidas por FES.

Microrganismo	Precipitante (v/v)	Tempo (min)	X_R (%)	F_P	Referência
<i>A. niger</i>	Etanol a 85%	15	65,0	0,74	Este trabalho
<i>A. niger</i>	Etanol a 80% Sulfato de amônio a 80%*	180	23,0 27,0	- -	FARINAS et al., 2011
<i>A. fumigates</i>	Etanol a 40%	30	69,6	1,33	FADEL et al., 2014
<i>T. harzianum</i>	Etanol a 80%	30	94,0 97,0	-	FADEL et al., 2001
<i>T. viride</i>	Sulfato de amônio a 60%*		82,0	1,1	IRFAN e SYED, 2012
<i>P. glabrum</i>	Sulfato de amônio a 90%*		84,0	3,25	KNOB et al., 2013

X_R (%) = percentual de atividade de xilanases recuperada no precipitado, F_P = fator de purificação da xilanase no precipitado. *Saturação final de sulfato de amônio.

O melhor resultado obtido neste trabalho para a precipitação de xilanases de FES estão próximos daqueles registrados no trabalho de Fadel et al. (2014), no qual foram recuperadas 69,6% da atividade xilanásica presente no complexo enzimático de *Aspergillus fumigates* com 40% de etanol em 30 min, porém, concentrações maiores de etanol levaram a uma queda na recuperação da atividade enzimática.

Altas recuperações de atividade de xilanase foram reportadas por Fadel et al. (2001) na precipitação de xilanases de *Trichoderma harzianum* com 80% de etanol: as recuperações foram de 94,0% e 97,0% da atividade de xilanase inicial, para pH inicial dos complexos enzimáticos ajustados em 4,5 e 7,0, respectivamente. Irfan e Syed (2012), trabalhando com xilanase de *T. viride* produzida em FES, registraram a recuperação de 82% com saturação de sulfato de amônio de 60%. No trabalho de Knob et al. (2013), 84,0% da atividade xilanásica inicial do extrato de *P. glabrum* foi recuperada com 90% de saturação de sulfato de amônio.

Os dados da cinética de precipitação (Tabela 4.7) apresentam como melhor resultado para a precipitação de xilanases com etanol de complexos produzidos em FS 88,1% de atividade de xilanase recuperada com fator de purificação de 1,03. Este resultado está próximo aos demais resultados extraídos de outros trabalhos de recuperação de xilanases por

precipitação com etanol. A Tabela 4.9 apresenta o comparativo dos resultados deste trabalho com os de outros autores para a precipitação de xilanases produzidos em FS.

Tabela 4.9: Comparativo de dados de precipitação de xilanases produzidas por FS.

Microrganismo	Precipitante (v/v)	Tempo (min)	X_R (%)	F_P	Referência
<i>A. niger</i>	Etanol a 85%	15	79,0	1,03	Este trabalho
<i>T. harzianum</i>	Etanol a 90%	0	100,0	-	MARIÑO et al., 2015
<i>Chainia sp.</i>	Etanol a 66%	"overnight"	78,5	13,70	VARMA et al., 1999
	Etanol a 80%		99,0	15,97	
<i>A. aculeatus</i>	Sulfato de amônio a 80%*		97,1	5,00	FUGIMOTO et al., 1995
<i>A. niger</i>	Sulfato de amônio a 70%*		78,6	1,85	AHMAD et al., 2013
<i>Bacillus cereus</i>	Sulfato de amônio a 80%*		93,0	4,50	MIASS e AHMED, 2014
<i>Bacillus cereus</i>	Sulfato de amônio a 80%*		51,8	1,21	ROY e ROWSHANUL, 2009
<i>B. megaterium</i>	Sulfato de amônio a 80%*		91,0	2,33	VIJAYALAKSHMI et al., 2013
<i>B. pumilus</i>	Sulfato de amônio a 50%*		40,4	6,8	MAHILRAJAN et al., 2014

X_R (%), percentual de atividade de xilanase recuperada no precipitado; F_P, fator de purificação da xilanase no precipitado. *Solução de sulfato de amônio saturada.

Altas recuperações foram registradas por Varma et al. (1999) na precipitação de xilanases ativas de *Chainia sp.* os quais reportaram a recuperação de 78,5% da atividade inicial de xilanase com fator de purificação de 13,7 utilizando etanol a 66% (v/v). Quando a concentração foi de 80% (v/v), a recuperação da atividade foi de 99,0% com um fator de purificação de 15,97. Já Mariño et al. (2015) registraram a recuperação total, isto é, de 100% da atividade xilanásica do complexo enzimático produzido por *T. harzianum* em FS utilizando a concentração de 90% de etanol.

Na análise de trabalhos de precipitação de xilanases é comum encontrarmos alguns trabalhos nos quais foi utilizado o mesmo agente precipitante em uma mesma concentração, porém, os percentuais de recuperação de proteínas e de xilanases foram diferentes. Diferenças deste tipo podem ser explicadas de duas maneiras. Primeiro, os microrganismos podem produzir uma grande variedade de enzimas com atividade xilanólítica, sendo que cada microrganismo produz essas enzimas em diferentes proporções. Assim, xilanases de complexos enzimáticos de fontes diferentes podem ter sua solubilidade afetada de maneiras diferentes ao mesmo precipitante. Segundo, se os complexos enzimáticos forem produzidos pelo mesmo microrganismo, deve-se observar as concentrações de proteínas e atividades enzimáticas iniciais destes complexos, pois pode haver em alguns casos uma relação entre a concentração inicial de algumas proteínas e a sua solubilidade em uma dada condição (SHIH et al., 1992, PINHEIRO et al., 2015). De maneira análoga, Pinheiro et al. (2015) relataram a relação entre a atividade xilanásica inicial com a recuperação destas por precipitação com etanol de complexo enzimático de *A.niger*.

Assim, os estudos de precipitação com etanol dos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger* em FES e em FS, feitos de maneira comparativa, mostraram que esses complexos comportam-se de maneiras diferentes, em termos da recuperação de proteínas totais e da atividade xilanásica, quando precipitados com etanol. Estas diferenças foram detectadas tanto no ponto de turvação quanto ao comportamento frente às variáveis de processo estudadas e refletiu no rendimento e na pureza de xilanases precipitadas. A utilização de delineamento experimental permitiu o melhoramento da recuperação de xilanases pela variação da temperatura, pH e concentração de etanol, sendo que recuperação de xilanases do complexo produzido em FS mostrou-se mais eficiente do que do complexo produzido em FES.

4.4. Estudos de precipitação de complexos enzimáticos com etanol em tanque agitado

Os estudos de precipitação em tanque agitado tiveram como objetivo a determinação das curvas de solubilidade de proteínas em função da concentração de etanol e aplicar o conceito de solutividade, determinando a curva de solutividade para xilanases também em função da concentração de etanol, assim como a utilização dessas curvas para uma possível precipitação em etapas. Além disso, a realização de testes de precipitação com a utilização de sementes, de maneira análoga à cristalização para a verificação do efeito destas no processo de precipitação de proteínas dos complexos enzimáticos, também foram implementados.

Nos estudos de precipitação realizados em tubos de ensaio, os complexos de FS apresentaram os melhores resultados de recuperação de xilanases. Por essa razão, os estudos de precipitação com determinação das curvas de solubilidade de proteínas e solutividade de xilanases, precipitação em duas etapas e uso de semente em tanque agitado foram realizados utilizando apenas o complexo enzimático de *A. niger* produzido em fermentação submersa.

4.4.1. Determinação da solubilidade de proteínas e da solutividade de atividade xilanásica em função da concentração de etanol para o complexo enzimático de FS

Os resultados dos experimentos para a verificação da variação da solubilidade aparente (S) das proteínas e da solutividade (S_{IV}) de xilanases (conforme definido no item 3.2.4.2) presentes no complexo enzimático produzido em FS após a precipitação com diferentes concentrações de etanol são apresentados na Tabela 4.10 e Figuras 4.10 e 4.11.

Tabela 4.10: Variação da solubilidade aparente (S) e solutividade (S_{IV}) do complexo enzimático pela adição do etanol.

Etanol (% v/v)	Solubilidade aparente (S)		Solutividade (S_{IV})		Fp
	(mg.mL ⁻¹)	(%)*	(UI.mL ⁻¹)	(%)*	
60	0,074 ± 0,003	77,1 ± 4,1	8,982 ± 0,133	97,8 ± 1,5	0,09
65	0,070 ± 0,003	72,7 ± 4,3	8,334 ± 0,464	90,8 ± 5,6	0,34
70	0,053 ± 0,002	55,5 ± 3,8	5,914 ± 0,186	64,4 ± 3,1	0,80
80	0,046 ± 0,002	47,9 ± 4,3	3,546 ± 0,169	38,6 ± 4,8	1,18
85	0,040 ± 0,001	41,9 ± 5,0	2,882 ± 0,154	31,5 ± 5,3	1,18
90	0,023 ± 0,003	24,0 ± 4,3	0,849 ± 0,035	9,3 ± 4,1	1,19

Condições de precipitação: pH 5,5; temperatura 4,0°C e velocidade de agitação de 150 rpm. Referências: Concentração de proteínas inicial, 0,096 mg.mL⁻¹; atividade xilanásica, 9,180 UI.mL⁻¹. *Porcentagens da concentração de proteínas e atividade xilanásica iniciais. Fp, fator de purificação.

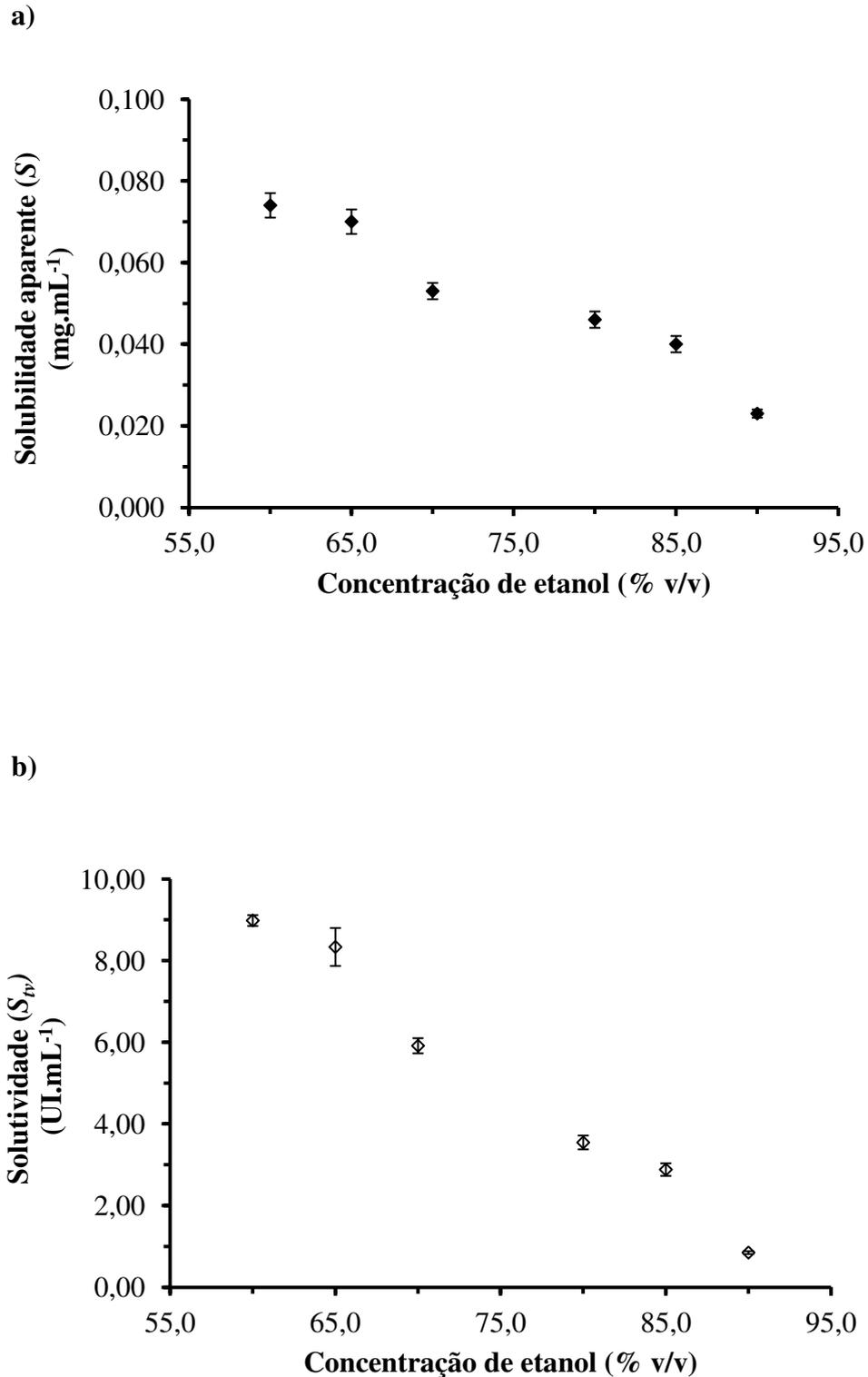


Figura 4.10: Variações da solubilidade aparente (a) e solutividade de xilanases (b) dos fermentados em função da concentração de etanol. Condições de precipitação: pH 5,5; temperatura, 4,0 °C; agitação de 150 rpm. Etanol a 5,0 °C adicionado a 2,0 mL.min⁻¹. Referências: Concentração de proteínas inicial, 0,096 mg.mL⁻¹; atividade de xilanase inicial, 9,180 UI.mL⁻¹. As barras representam os desvios padrão de quatro experimentos.

Tanto a solubilidade aparente (S) quanto a solutividade (S_n) diminuíram à medida que a concentração de etanol foi elevada (Figura 4.10). Em termos percentuais, a recuperação de xilanases a 85% de etanol foi menor que aquelas obtidas neste trabalho nos estudos em tubos de ensaio (68,5% contra $\approx 80,0\%$). Já o fator de purificação das xilanases precipitadas no tanque agitado foi maior do que nos precipitados em tubos de ensaio (1,19 e 1,03, respectivamente). Quando a precipitação foi realizada com a concentração de etanol de 90% recuperou-se $\approx 91\%$ das xilanases presentes no fermentado. Este valor foi menor do que o obtido por Mariño et al. (2015) na precipitação de xilanases de *T. harzianum* no qual 100% da atividade xilanásica do fermentado foi recuperado. Os ensaios nas concentrações de etanol de 80, 85 e 90%, apesar de apresentarem valores de recuperação de proteínas totais e de xilanases diferentes, seus valores de fator de purificação foram praticamente os mesmos.

A Figura 4.11 mostra o gráfico da solubilidade aparente e solutividade como percentuais de seus valores no fermentado em função da concentração de etanol. A comparação das duas curvas mostra a possibilidade de se realizar precipitação em etapas (com corte) para enriquecimento do precipitado, em termos de xilanase, em uma segunda precipitação a concentração mais elevada de etanol. O gráfico da solubilidade aparente e solutividade relativas em função da concentração de etanol apresenta um ponto de interseção das duas curvas, a concentração de 76,6% v/v de etanol. Na possibilidade da precipitação em etapas este pode ser considerado como o ponto de operação do corte (POC).

Desta forma, precipitações realizadas com concentrações de precipitante abaixo do POC, ou seja, com concentrações de etanol menores que 76,6% v/v, resultariam em precipitados enriquecidos com um dos componentes (proteínas totais, que sabemos englobar também as xilanases), por outro lado, precipitações realizadas com concentrações do precipitante acima deste ponto de operação, levariam à obtenção de um precipitado enriquecido com o outro componente (xilanases). No caso em estudo, para concentrações de etanol mais baixas que o POC de 76,6% de etanol, a solutividade é percentualmente maior que a solubilidade aparente, teoricamente sendo possível se realizar precipitação com corte. Porém, a relevância prática técnica deste tipo de precipitação depende dos valores de percentuais de proteínas a ser descartada no precipitado e atividade enzimática a ser perdida neste.

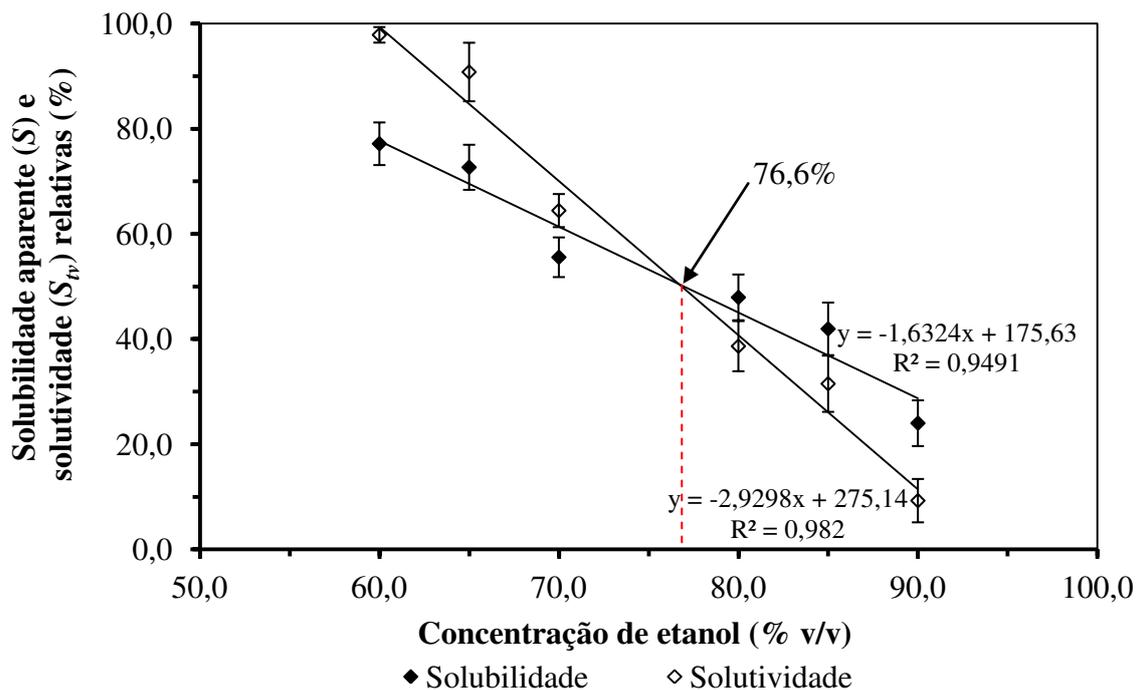


Figura 4.11: Variação da solubilidade aparente (S) e da solutividade de xilanases (S_{iv}), em termos percentuais, dos fermentados em função da concentração de etanol (v/v). Condições de precipitação: pH 5,5; temperatura 4,0 °C e agitação de 150 rpm. Etanol a 5,0 °C adicionado na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Referências: Concentração de proteínas inicial, 0,096 mg.mL⁻¹; atividade de xilanase inicial, 9,180 UI.mL⁻¹. As barras representam os desvios padrão de quatro experimentos.

4.4.2. Estudo de precipitação de xilanases em duas etapas

4.4.2.1. Estudo cinético de recuperação de proteínas e atividade xilanásica

Os resultados de solubilidade aparente e solutividade de xilanases nos forneceram a condição favorável ao corte em termos de concentração de etanol. Porém, para a determinação do tempo de cada etapa de precipitação com corte, era necessária análise da cinética de recuperação de proteínas e atividade xilanásica em termos percentuais no tempo. Esses dados são apresentados na Tabela 4.11 e representados, para melhor visualização, na forma de gráficos na Figura 4.12.

Os resultados da Figura 4.12 mostram uma variação, para valores mais elevados, na atividade xilanásica principalmente na concentração de proteínas das amostras coletadas após 60 min. Este comportamento pode ter sua origem na formação de polimorfos que são compostos quimicamente idênticos, mas que apresentam estruturas cristalinas diferentes e

Tabela 4.11: Cinética de recuperação de proteínas e atividade enzimática nos precipitados em diferentes concentrações de etanol.

Tempo (min)	Concentração de etanol (v/v)									
	60%		65%		70%		80%		90%	
	Proteína (%)	Xilanase (%)	Proteína (%)	Xilanase (%)	Proteína (%)	Xilanase (%)	Proteína (%)	Xilanase (%)	Proteína (%)	Xilanase (%)
0	21,6±0,9	1,8±0,4	28,8±1,2	14,2±1,0	48,2±1,6	38,5±1,0	57,2±1,3	68,6±0,7	71,8±4,9	87,0±2,2
15	22,8±0,6	2,3±0,6	28,0±0,8	12,8±1,1	47,3±4,2	36,6±1,9	58,4±4,1	68,7±2,9	70,0±3,0	95,5±6,1
30	22,4±0,7	2,0±0,3	19,2±1,0	4,5±0,4	44,8±5,4	33,8±1,2	55,9±1,0	65,0±3,3	81,7±2,2	95,0±2,7
60	25,0±0,7	2,6±0,2	41,6±3,2	5,2±0,3	42,4±4,1	35,1±0,9	64,1±4,4	66,1±1,5	81,5±3,9	94,0±2,3
120	24,5±0,4	2,7±0,2	52,7±2,2	14,5±0,9	45,6±0,9	34,9±1,0	92,5±10,4	76,9±4,5	81,5±2,6	100,9±3,8
180	28,3±4,0	2,5±0,2	63,4±2,3	17,0±1,3	85,3±2,0	51,6±1,4	102,3±3,6	88,7±6,8	94,1±4,0	101,0±3,0

Percentual da concentração de proteínas e da atividade de xilanase recuperadas após a precipitação do fermentado com etanol em diferentes tempos de incubação. Referências: concentração de proteínas inicial, 0,10 mg.mL⁻¹ exceto pra 80% v/v de etanol que foi 0,11 mg.mL⁻¹. Atividade xilanásica inicial para etanol 60%, 9,14 UI.mL⁻¹; etanol 65%, 9,24 UI.mL⁻¹; etanol 70%, 9,07 UI.mL⁻¹; etanol 80%, 9,29 UI.mL⁻¹; etanol 85%, 9,38 UI.mL⁻¹; etanol 90%, 8,97 UI.mL⁻¹. Condições: pH 5,50, temperatura 4,0 °C e agitação de 150 rpm. Etanol a 5,0 °C adicionado na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Desvio padrão para o resultado de quatro experimentos.

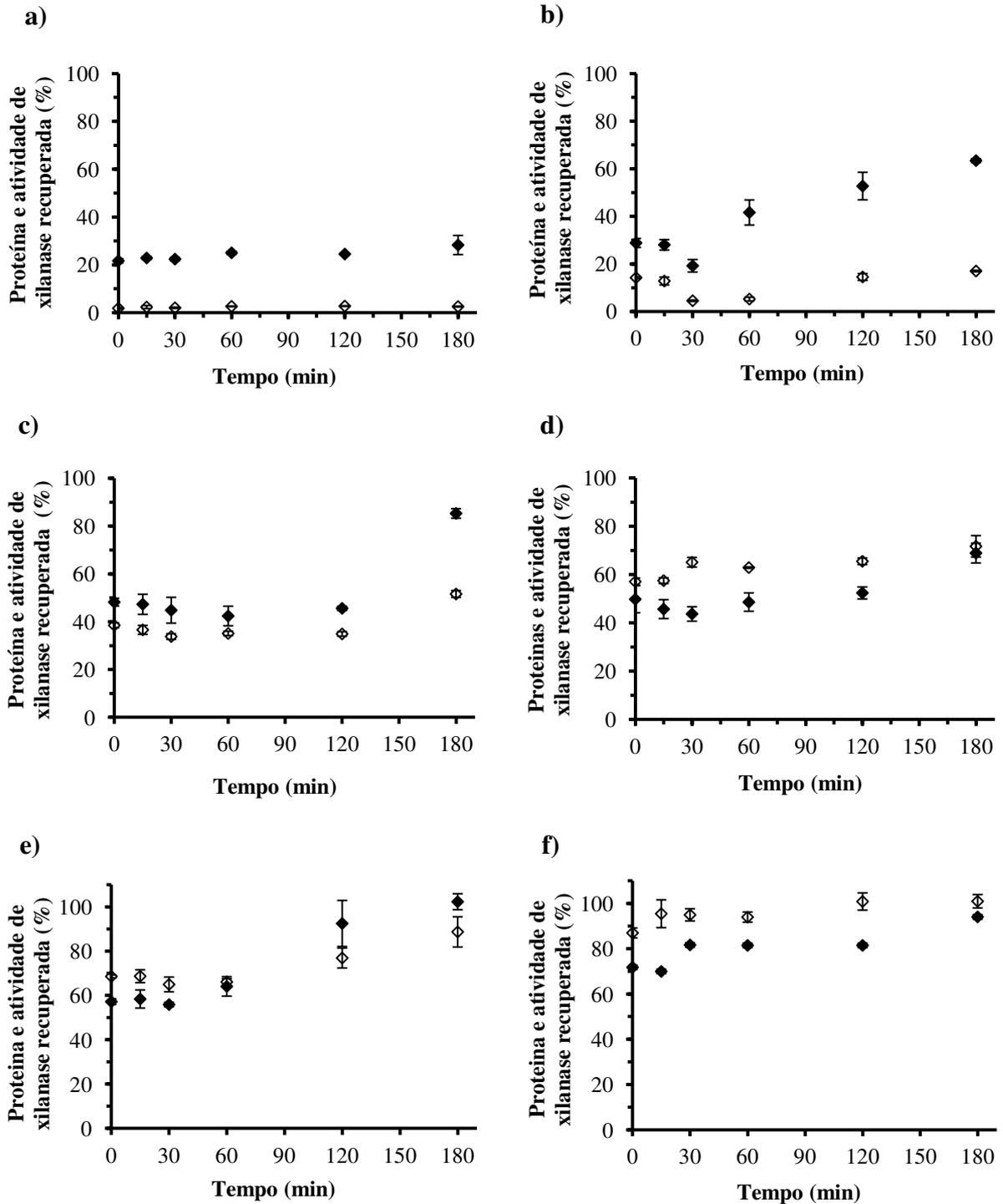


Figura 4.12: Cinética da concentração de proteínas (◆) e da atividade de xilanase (◇) recuperadas, em termos percentuais, após a precipitação do fermentado com etanol em diferentes tempos de incubação com etanol a: **a)** 60%, **b)** 65%, **c)** 70%, **d)** 80%, **e)** 85% e **f)** 90%. As barras representam os desvios padrão das triplicatas dos experimentos. Condições: pH, 5,50; temperatura, 4,0 °C; agitação, 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0 °C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹.

essa diferença leva a comportamento em termos de solubilidade, taxa de nucleação e crescimento, também diferentes. Segundo Giulietti et al. (2001), no processo de precipitação moléculas orgânicas e biomoléculas, devido às suas grandes dimensões, tendem a formar muitos polimorfos. Outra possível explicação para esse fenômeno seria que proteínas (que não são xilanases) presentes no fermentado são mais suscetíveis à desnaturação pelo etanol, porém, essa desnaturação depende tanto da concentração de etanol quanto do tempo de exposição e com o passar do tempo mais proteínas são desnaturadas e precipitadas.

Considerando os pontos até 60 min, os quais não apresentam grandes variações entre eles, para todas as concentrações de etanol utilizadas observa-se que na concentração de 65% etanol (Figura 4.12b) no tempo de 60 min há uma maior recuperação percentual de proteínas totais do que atividade de xilanase, condição na qual precipita-se uma maior quantidade de outras proteínas do que de xilanases; esse pode ser considerado como o ponto para o corte. Por outro lado, a concentração de 90% etanol (Figura 4.12f) é aquela em que há uma maior recuperação de atividade de xilanase independente do tempo de incubação. Essa condição, portanto, pode ser utilizada para a segunda etapa de precipitação na qual seriam necessários apenas 15 min de tempo de incubação.

4.4.2.2 Precipitação de xilanases em duas etapas

A precipitação de xilanases em duas etapas foi realizada baseada nos dados obtidos nas curvas de solubilidade e solutividade e pela cinética de precipitação. Segundo Shih et al. (1992), para algumas proteínas, existe uma relação entre a concentração inicial de proteínas e a sua solubilidade quando medida por precipitação e entre a atividade enzimática inicial e sua solutividade em determinada condição. Dessa forma, os parâmetros aqui estabelecidos para a precipitação de duas etapas são válidos apenas para este fermentado. Para fermentados com diferentes concentrações de proteínas e atividade xilanásica iniciais, a viabilidade da precipitação em duas etapas, assim como os parâmetros a serem adotados (tempo e concentração de precipitante em cada etapa), dependerá das curvas de solubilidade e solutividade específicas para estes.

Os resultados dos experimentos de precipitação de xilanases dos fermentados de *A. niger*, realizados em duas etapas, utilizando etanol como agente precipitante, são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Precipitação em duas etapas de xilanases do fermentado de *A. niger*.

	Proteína		Xilanase		A _E (UI.mg ⁻¹)	F _P
	(mg.mL ⁻¹)	(%)	(UI.mL ⁻¹)	(%)		
Precipitação direta (90% etanol)	0,082 ± 3,9x10 ⁻³	81,5 ± 3,9	8,43 ± 2,1x10 ⁻¹	94,0 ± 2,3	102,8	1,2
Fermentado bruto	0,098 ± 2,0x10 ⁻³	100,0 ± 2,3	9,18 ± 2,7x10 ⁻²	100,0 ± 0,3	93,67	1,0
Etapa 1 (65% etanol)	0,041 ± 0,9x10 ⁻³	41,9 ± 2,2	0,62 ± 0,6x10 ⁻³	6,8 ± 1,0	15,15	0,2
Etapa 2 (90% etanol)	0,043 ± 1,4x10 ⁻³	44,3 ± 3,2	7,61 ± 0,22	82,9 ± 2,9	176,91	1,9
Total recuperado	0,084	86,2	8,228	89,7		

A_E, atividade específica de xilanase; F_p, fator de purificação. Volume de fermentado inicial, 35,0 mL; pH, 5,5; temperatura, 4,0 °C; velocidade de agitação, 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0 °C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Precipitação direta: proteína inicial, 0,10 mg.mL⁻¹; atividade xilanásica inicial, 8,97 UI.mL⁻¹.

O fermentado bruto continha uma concentração de proteínas de 0,098 mg.mL⁻¹, atividade xilanásica de 9,180 UI.mL⁻¹ e atividade específica de 93,67 UI.mg⁻¹. A precipitação com 65% de etanol (Etapa 1) resultou em um precipitado que, quando dissolvido em um volume igual ao do fermentado precipitado, continha 42% da concentração da proteína inicial (0,041 mg.mL⁻¹); por outro lado, a atividade xilanásica era de apenas 0,62 UI.mL⁻¹, ou seja, 6,8% da atividade inicial. A atividade específica neste precipitado era de 15,15 UI.mg⁻¹.

No final da segunda etapa de precipitação (90% de etanol), o precipitado obtido continha 44,3% da proteína inicial (0,043 mg.mL⁻¹). Porém a atividade recuperada nesta etapa foi de 7,61 UI.mL⁻¹ ou 82,9 % da atividade xilanásica inicial. Com esses valores, a atividade enzimática específica foi elevada para 176,91 UI.mg⁻¹.

O somatório do percentual da concentração de proteínas e atividade xilanásica recuperadas nas duas etapas foram de 86,2 e 89,7%, respectivamente. As proteínas totais (incluindo xilanases) não recuperadas são aquelas que, por características próprias como massa molecular, constituição de aminoácidos, estrutura tridimensional e pI, são solúveis nas

condições de operação. Quanto à atividade de xilanase não detectada nos precipitados, lançaremos mão do conceito de solutividade proposto por Pinheiro et al. (2015), segundo o qual a atividade de xilanase não detectada nos precipitados não se refere apenas às moléculas de enzimas que ainda encontram-se solúveis, mas ao somatório destas moléculas que ainda estão em solução ativas ou não e das enzimas precipitadas desnaturadas.

Os resultados da precipitação em duas etapas mostraram que o procedimento possibilitou um aumento na atividade específica de xilanase conduzindo ao enriquecimento de atividade de xilanase no precipitado a um fator de purificação de 1,9. Quando comparado com a precipitação direta a 90% de etanol essa diferença é menor, pois nesta condição a atividade específica de xilanase passou de 89,7 para 102,8 UI.mg⁻¹ e fator de purificação de 1,2 (Tabela 4.11). Quando comparada à precipitação direta, a precipitação em duas etapas possibilitou um aumento de 72% na atividade enzimática específica e de 58% no fator de purificação. Estes resultados abrem a possibilidade da utilização da precipitação em duas etapas com etanol de como uma etapa de purificação de xilanases de *A. niger*. Além disso, mostra a utilização eficiente da curva de solutividade para a determinação do ponto de operação de corte (POC), sendo esta uma informação necessária de se ter acerca da precipitação de xilanases de *A. niger* com etanol.

4.5. Estudo de precipitação com uso de semente

No estudo de precipitação com o uso de semente, utilizaram-se as sementes de maneira análoga à utilização na cristalização de proteínas, para verificar a influência da adição de semente sobre a recuperação de proteínas e atividade xilanásica no precipitado. Na cristalização de proteínas, a técnica de semeadura é utilizada para eliminar a nucleação primária e para aumentar a tendência da formação de cristais isomorfos.

4.5.1. Determinação do ponto de turvação do fermentado durante a adição de etanol em tanque agitado

Realizou-se a determinação do ponto de turvação dos complexos para a obtenção da concentração de etanol no fermentado apropriada para a adição da semente. Nessa concentração de etanol a supersaturação é alta suficiente para garantir que a semente não seja

dissolvida no meio. Apesar desses estudos já terem sido realizados neste trabalho em tubos de ensaio, com a mudança para o tanque agitado houve algumas modificações no sistema: aumento do volume de trabalho, adição do sistema de agitação e mudança na temperatura de incubação (de 15,0 para 5,0°C). Essas modificações poderiam provocar alteração no ponto de turvação. A evolução desses experimentos é mostrada na Figura 4.13.

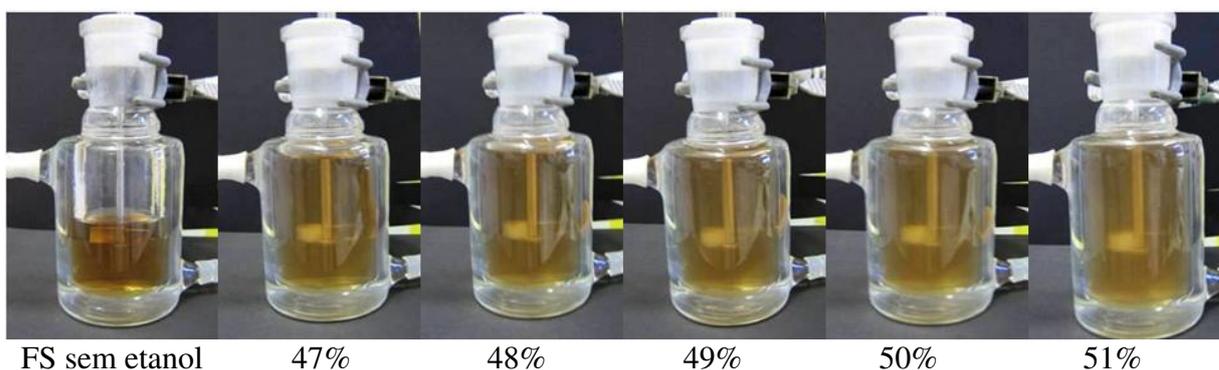


Figura 4.13: Determinação visual do ponto de turvação do fermentados de FS pela a adição de etanol. Condições: pH inicial do fermentado 5,5; temperatura de 4,0 °C e agitação de 150 rpm. Adição de etanol a 5,0 °C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹.

Assim como nos experimentos realizados em tubo de ensaio, nos estudos em tanque agitado o fermentado de FES (dados não apresentados) atingiu o ponto de turvação visual à uma menor concentração de etanol adicionado ao meio do que o fermentado de FS. Porém, nos experimentos realizados em tanque agitado, tanto em FES quanto FS esse ponto foi detectado visualmente com uma concentração de etanol mais baixa quando comparado com os valores encontrados nos experimentos em tubo de ensaio. Em tanque agitado, o ponto de turvação do fermentado de FS foi 51% v/v de etanol enquanto que em tubo de ensaio esse valor foi de 56%. Esta pequena diferença de concentração do precipitante para a turvação visual do meio pode estar relacionada à diminuição da temperatura do sistema (de 15 para 5 °C), uma vez que a solubilidade diminui com diminuição da temperatura. Outro fator seria a mistura mais eficiente realizada pelo sistema de agitação presente no tanque utilizado para estes experimentos. Segundo Byrne e Fitzpatrick (2002), a agitação do sistema aumenta a possibilidade de colisão e agregação entre as moléculas.

4.5.2. Produção e características das sementes

Para os estudos com o uso de semente foram preparados três tipos de semente:

- a) Semente 1 – sólido obtido pela liofilização do precipitado do fermentado com 90% v/v de etanol a 4,0°C por 1 h;
- b) Semente 2 – sólido obtido pela liofilização do precipitado do fermentado com 90% v/v de etanol com a adição de semente 1;
- c) Semente BSA – sólido obtido pela mistura homogênea de albumina de soro bovino (BSA) e acetato de sódio.

A caracterização dos sólidos (sementes) obtidos consta na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Características dos sólidos utilizados como semente.

	Semente 1	Semente 2	Semente BSA
Proteína (mg.mL ⁻¹)	0,024	0,018	
Atividade xilanásica (UI.mL ⁻¹)	2,149	2,798	
Atividade específica (UI.mg ⁻¹)	89,5	155,3	
Proteína no sólido (% m/m)	0,53	0,42	
Atividade de xilanase no sólido (UI.mg ⁻¹)	0,478	0,533	
BSA (% m/m)			0,53
Acetato de sódio (% m/m)			99,47

4.5.3. Precipitação com a presença de semente

A técnica da semeadura, muito utilizada na cristalização de proteínas para o controle da nucleação e algumas características do cristal resultante, foi utilizada de maneira análoga neste trabalho, com o objetivo de aumentar a presença de enzimas com atividade xilanásica no precipitado obtido. Durante a revisão bibliográfica, não foram encontrados registros de trabalhos com relatos do uso de semente como técnica de melhoramento da recuperação por precipitação de enzimas ativas a partir de meios complexos. Assim, os resultados dos experimentos de precipitação de xilanases com etanol, utilizando semente, obtidos neste

trabalho foram analisados com base em dados advindos do uso de semente em cristalização. Estes resultados dos experimentos de precipitação com a utilização de semente estão apresentados na Tabela 4.14.

Para a determinação do ponto da concentração de etanol no qual a semente deveria ser adicionada utilizou-se como referência o ponto de turvação do fermentado. A concentração de etanol de 51% v/v é o ponto de turvação do fermentado obtido experimentalmente de forma visual. Nesse ponto, o nível de saturação de etanol no meio é alto o suficiente para garantir que a semente não fosse dissolvida. Nesta concentração de etanol, realizaram-se experimentos com duas cargas diferentes de semente (1,5 e 3,0% da carga proteica contida no fermentado a ser precipitado), com o objetivo de observar se o aumento da carga de semente adicionada acarretaria ou não na recuperação de precipitados com maior pureza em termos de xilanases.

Sabe-se, porém que no ponto de turvação a supersaturação é alta o suficiente para a ocorrência de nucleação primária, ou seja, o processo de formação da fase sólida no meio inicia-se antes mesmo de ser detectada visualmente (ponto de turvação). Por isso, foram realizados experimentos com a adição de semente à concentração de 48% v/v de etanol (um pouco abaixo do ponto de turvação). Como a técnica de semeadura deve induzir a precipitação de biomoléculas com características parecidas com as da semente adicionada, espera-se que a adição da semente no ponto mais inicial da formação da fase sólida conduza à recuperação de precipitados com maior grau de pureza em termos de xilanases.

A realização de experimento utilizando semente de BSA foi necessária para responder três questões principais:

- 1) O efeito da semente no aumento de pureza das xilanases recuperadas é causado apenas pela presença de uma partícula sólida qualquer no meio?
- 2) O efeito da semente no aumento da pureza das xilanases recuperadas é decorrente da presença de uma proteína qualquer (BSA) no meio?
- 3) O efeito da semente no aumento na recuperação de xilanases é causado pela presença de uma partícula sólida com as mesmas características daquelas que estão presente no complexo?

Tabela 4.14: Precipitação do fermentado com a utilização de semente: percentual de (P_R) proteínas e (X_R) atividade xilanásica recuperadas.

Etanol (%v/v)	Adição a 51% de etanol						Adição a 48% de etanol					
	Controle		Semente 1 - 1,5%		Semente 1 - 3,0%		Semente 1 - 1,5%		Semente BSA - 1,5%		Semente 2 - 1,5%	
	P _R (%)	X _R (%)	P _R (%)	X _R (%)	P _R (%)	X _R (%)	P _R (%)	X _R (%)	P _R (%)	X _R (%)	P _R (%)	X _R (%)
60	35,4±0,4	2,5±0,3	33,1±3,5	3,3±0,6	31,5±0,6	2,8±0,4	32,3±5,7	3,4±0,3	-	-	-	-
65	46,1±0,2	11,8±0,5	39,1±3,6	10,8±1,1	38,7±3,0	12,0±1,8	36,6±3,0	10,8±1,4	-	-	-	-
70	62,2±5,6	42,5±0,4	58,0±4,8	54,2±1,7	69,4±3,5	61,9±5,3	58,1±2,5	61,1±3,4	47,9±3,0	34,8±6,2	59,2±0,5	49,1±4,3
80	81,7±6,1	63,0±0,1	82,4±3,0	73,0±2,7	89,5±3,3	76,2±2,9	69,9±3,8	78,8±3,5	58,8±4,7	50,4±0,9	65,6±1,2	83,5±3,7
85	94,4±3,5	75,0±4,7	92,3±3,3	84,9±4,2	106,5±2,8	80,1±4,1	102,2±5,1	96,1±4,4	60,9±5,0	77,6±4,9	82,6±4,9	92,6±8,6
90	98,2±3,0	88,9±3,2	97,3±2,1	100,8±4,4	104,0±3,8	106,1±5,4	105,4±0,7	106,6±0,5	64,3±1,7	95,0±2,1	108,7±6,1	105,3±0,3

Experimentos: controle; com semente 1- 1,5% e 3,0% (adição da semente a 51% etanol); semente 1- 1,5%, semente BSA e semente 2- 1,5% (adição da semente a 48% etanol). Condição de precipitação: pH 5,5 a 4,0°C e agitação de 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0°C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Concentração de proteínas inicial: controle, 0,10 mg.mL⁻¹; semente 1-1,5% (etanol 51%), 0,10 mg.mL⁻¹; semente 1- 3,0% (etanol 51%), 0,12 mg.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (etanol 48,0%), 0,09 mg.mL⁻¹; semente BSA- 1,5% (etanol 48,0%), 0,10 mg.mL⁻¹; semente 2- 1,5% (etanol 48,0%), 0,11 mg.mL⁻¹. Atividade xilanásica inicial: controle, 9,30 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (etanol 51%), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0% (etanol 51%), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (etanol 48,0%), 8,31 UI mL⁻¹; semente BSA- 1,5% (etanol 48,0%), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 2- 1,5% (etanol 48,0%), 10,18 UI.mL⁻¹.

De uma forma geral, observou-se que a utilização de semente no sistema não resultou em grandes variações na recuperação de proteínas totais quando comparados com experimentos sem a adição de semente (controle). Esse comportamento já era esperado, porém, o ideal seria a diminuição da presença de proteínas no precipitado fato que aconteceu apenas quando o experimento foi realizado utilizando BSA como semente. Nestes experimentos, com concentrações de etanol a partir de 70% v/v, a adição de BSA como semente resultou na diminuição da recuperação de proteínas nos precipitados em todas as concentrações do precipitante estudadas sendo que a maior queda em relação ao controle foi 34%, observada nas concentrações de 85 e 90% v/v de etanol.

No caso da recuperação da atividade de xilanase nos precipitados, para a melhor visualização e análise dos resultados foram gerados gráficos comparativos entre os resultados dos experimentos (Figura 4.14).

Para a atividade xilanásica recuperada nos precipitados, a utilização de semente (produzida como precipitado do próprio fermentado), nas precipitações com concentrações de etanol mais baixas (60 e 65% v/v), a presença da semente no sistema não afetou na recuperação da atividade xilanásica nos precipitados. Por outro lado, quando a concentração do precipitante foi elevada para valores iguais ou maiores que 70%, o uso de semente resultou em aumento de até 21% (96,1% no teste com semente contra 75,0% no controle) na atividade xilanásica recuperada na precipitação com 85% de etanol utilizando 1,5% da semente 1 adicionada a 48% v/v de etanol (Figura 4.14c). O registro de pequeno efeito do etanol em concentrações abaixo de 70% v/v sobre a recuperação de xilanases dos fermentados, com ou sem semente, pode ser atribuído a fatores como a baixa concentração de enzimas nos fermentados ou a baixas massas moleculares destas, pois segundo Scopes (1987) e Oh et al. (2011) moléculas de menor tamanho necessitam de uma concentração maior de solvente para a sua precipitação.

O aumento na atividade xilanásica recuperada nos testes com semente em relação ao controle foi detectado em todos os experimentos, exceto no experimento utilizando BSA como semente (Figura 4.14d) no qual, considerando o desvio padrão, não houve aumento da recuperação de atividade xilanásica em nenhuma das concentrações de etanol. A presença de BSA no meio não resultou no aumento da recuperação de xilanases, mas em alguns casos registrou-se efeito negativo com a diminuição na recuperação de xilanases como nas precipitações com as concentrações de etanol de 70 e 80% v/v. Na cristalização de proteínas,

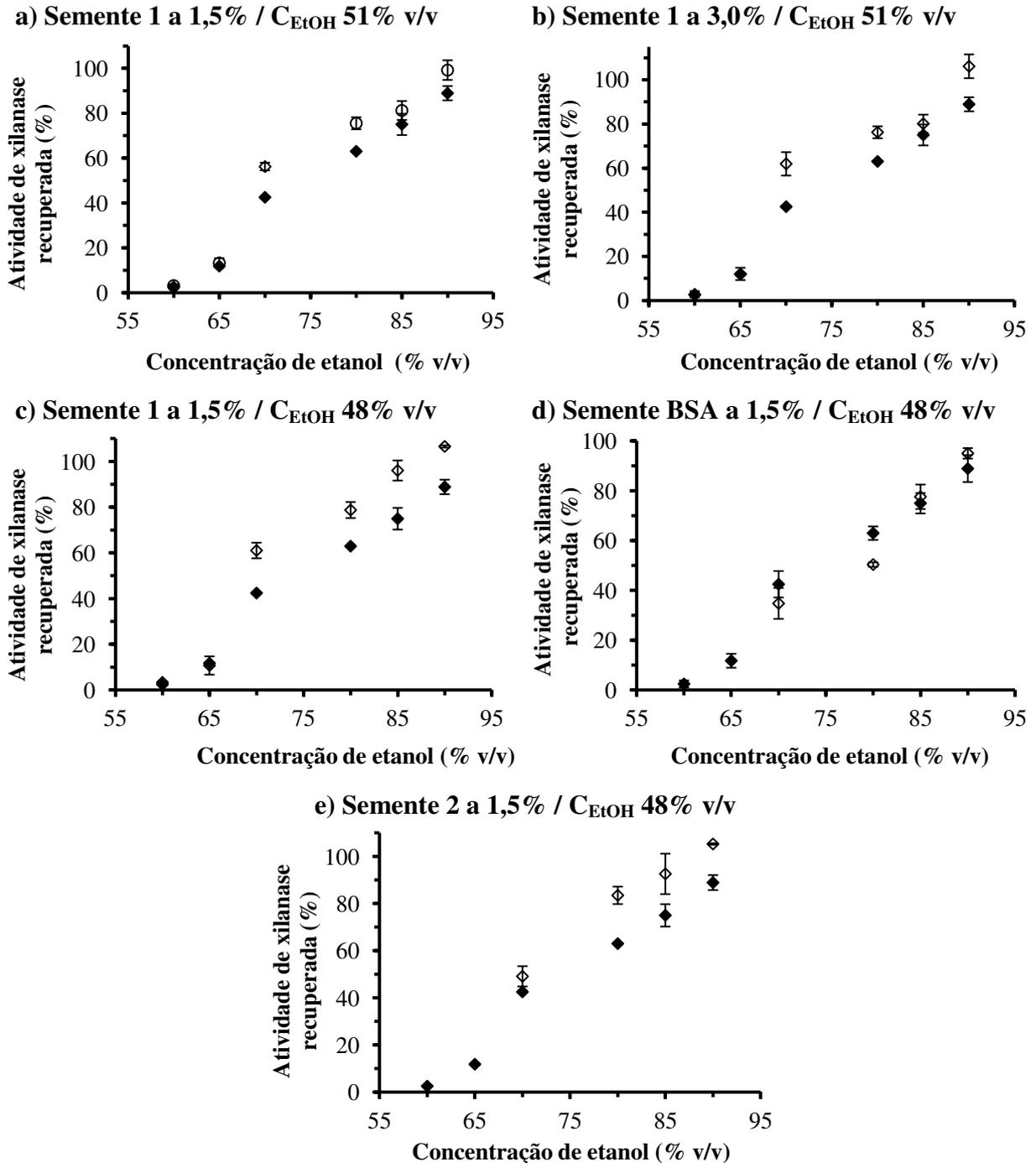


Figura 4.14: Precipitação de xilanases com uso de semente. Comparativos entre os experimentos controle (◆) com: **a)** semente 1- 1,5%, etanol 51% (◇); **b)** semente 1- 3,0%, etanol 51% (◇); **c)** semente 1- 1,5%, etanol 48% (◇), **d)** semente BSA- 1,5%, etanol 48% (◇) e **e)** semente 2- 1,5%, etanol 48% (◇). As barras representam os desvios padrão dos valores obtidos em triplicata. Atividade de xilanase inicial dos fermentados nos experimentos: controle, 9,30 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (51% etanol), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0 (51% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (48% etanol), 8,31 UI.mL⁻¹; semente BSA- 1,5% (48% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 2- 1,5% (48% etanol), 10,17 UI.mL⁻¹. C_{EtOH}, concentração de etanol quando da adição da semente.

as impurezas adsorvidas na superfície dos sólidos podem reduzir a taxa de crescimento de cristais, reduzindo ou impedindo as etapas de crescimento.

Os melhores resultados em termos de recuperação da atividade xilanásica, quando comparados com os experimentos ao controle, foram registrados nos experimentos utilizando 1,5% de semente 1 (Figura 4.14c) e 1,5% da semente 2 (Figura 4.14e).

A Figura 4.15 apresenta os gráficos comparativos entre os resultados dos experimentos com a utilização de semente em diferentes condições. O gráfico comparativo dos resultados dos experimentos nos quais variou-se a massa de semente adicionada (Figura 4.15a) mostrou que o aumento da massa de semente adicionada de 1,5% para 3,0% não refletiu em maior recuperação de atividade xilanásica. Este resultado está de acordo com os obtidos por Melia e Moffitt (1964) que estudaram a nucleação secundária em soluções aquosas de KCl e relataram que a taxa de nucleação secundária foi independente do número de sementes adicionadas. Por outro lado, Cayey e Estrin (1967) estudaram o efeito de semente sobre a nucleação secundária de uma solução supersaturada de sulfato de magnésio em um cristalizador agitado e relataram um estranho efeito da quantidade de sementes acrescentadas na indução da nucleação: uma semente de menos de 2 mg foi mais eficaz do que a semente de 50 mg, porém, menos eficaz do que 500 mg.

A variação no ponto de adição da semente (Figura 4.15b) proporcionou o aumento na recuperação percentual de atividade de xilanase quando a semente foi adicionada à concentração de etanol abaixo do ponto de turvação (48% v/v). Segundo Saridakis et al. (2002) a formação dos primeiros núcleos ocorre muito tempo antes que se tornem visíveis inclusive ao microscópio. Isso indica que no ponto de turvação visual já existem núcleos formados e estes acabam por concorrer com a semente pelas proteínas a serem precipitadas.

O gráfico comparativo do efeito da semente 1 com a semente BSA sobre a recuperação de xilanases (Figura 4.15c), mostrou uma recuperação da atividade xilanásica com a adição da semente BSA muito menor que aquele obtido com a semente 1, em média 21% para concentrações de etanol de 70, 80, 95 e 90% v/v. Este resultado mostrou que a presença da semente no processo não causa apenas o efeito da presença de uma partícula qualquer ou de uma proteína qualquer, mas, esse efeito é creditado à presença de uma partícula proteica com as mesmas características daquelas presentes no fermentado. Apesar de não apresentar efeito positivo para precipitação de xilanases ativas, a semente BSA não teve

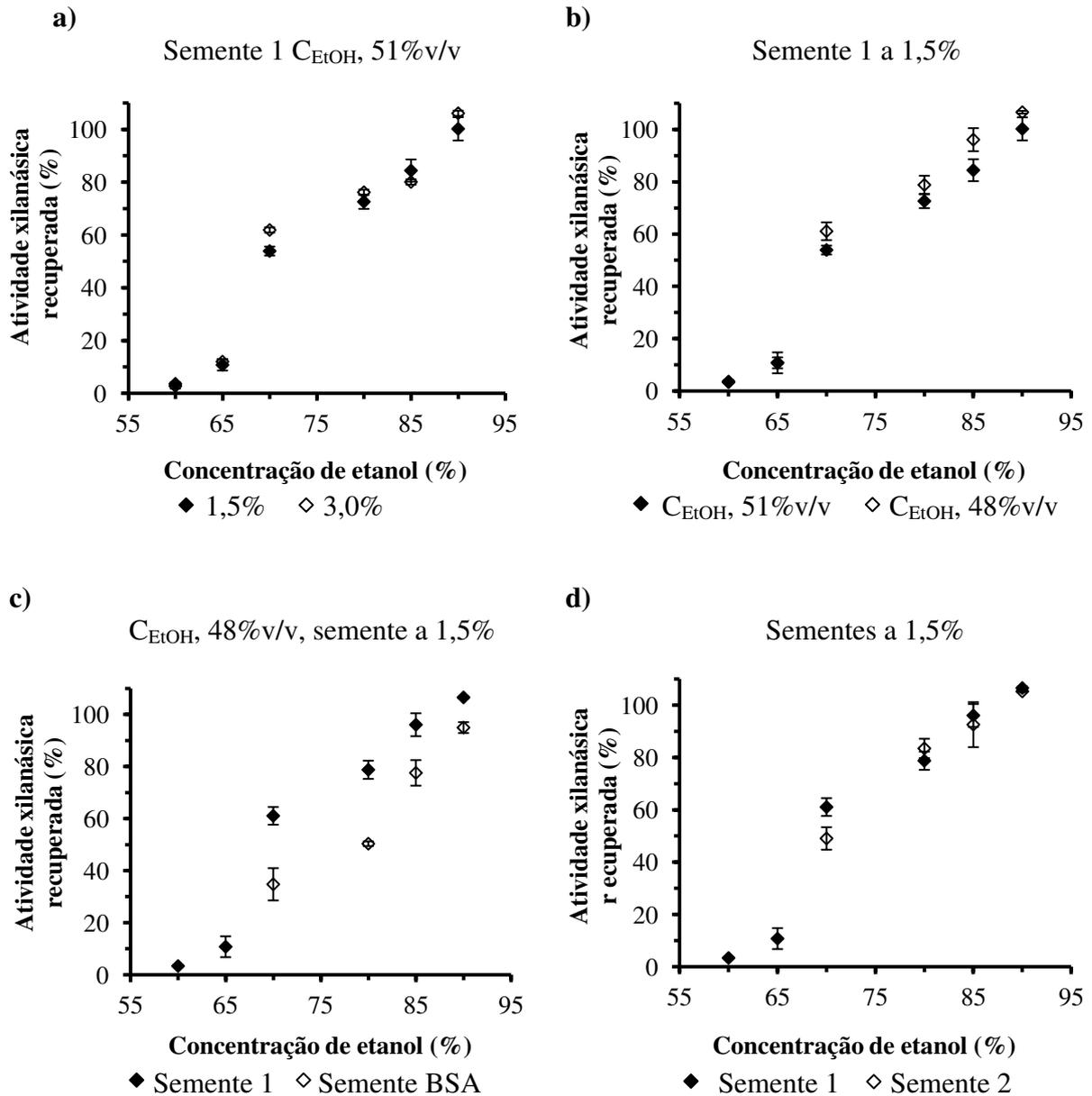


Figura 4.15: Percentual de atividade de xilanase recuperada. Comparativos dos experimentos com semente: a) semente 1- 1,5%, etanol 51% (◆) e semente 1- 3,0%, etanol 51% (◇); b) semente 1- 1,5%, etanol 51% (◆) e semente 1- 1,5%, etanol 48% (◇); c) semente 1- 1,5%, etanol 48% (◆) e semente BSA - 1,5%, etanol 48% (◇), d) semente 1- 1,5%, etanol 48% (◆) e semente 2- 1,5%, etanol 48% (◇). As barras representam os desvios padrão dos valores obtidos em triplicata. Atividade de xilanase inicial do fermentado nos experimentos com: semente 1- 1,5% (51% etanol), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0 (51% etanol); 10,00 UI.mL⁻¹, semente 1- 1,5% (48% etanol), 8,31 UI mL⁻¹, semente BSA- 1,5% (48% etanol), 10,00 UI.mL⁻¹, semente 2- 1,5% (48% etanol), 10,17 UI mL⁻¹.

comportamento de impureza no sistema pois, segundo Blow et al. (1964) e Aschaffenburg et al. (1972), as impurezas adsorvidas na superfície da semente pode reduzir a taxa de crescimento, reduzindo ou impedindo o crescimento. No entanto, neste trabalho o resultado de recuperação da atividade xilanásica com a semente BSA foi igual ao obtido no experimento controle (sem semente) (Figura 4.14d).

Quando comparamos os resultados dos experimentos utilizando a semente 1 com aqueles nos quais foram utilizados a semente 2 (Figura 4.15d) não observa-se diferença na atividade recuperada nos dois experimentos, exceto a 70% de etanol. Estes resultados, porém, não eliminam a possibilidade de melhoria de rendimento e purificação pelo método de semeadura em sequência que pode ser repetida várias vezes. Na cristalização de proteínas, em alguns trabalhos para a obtenção de resultados desejáveis apenas duas rodadas de semeadura foram necessárias (BERGFORS, 2003) em outras ocasiões um número de sete e até dez rodadas de semeadura sequencial podem ser necessárias (THALLER et al., 1981).

Os valores de recuperação de xilanases obtidos nos estudos de precipitação de xilanases de fermentados de *A. niger*, com etanol como agente precipitante e utilizando a técnica de semeadura, foram usados para calcular a solutividade (S_{iv}) das xilanases para cada condição de precipitação (Tabela 4.15). Com os valores de solutividade foi possível o cálculo da efetividade da semente (η), ou seja, o efeito da presença da semente no meio sobre a recuperação da xilanases presentes, mostrados na Tabela 4.16 e ainda a construção do gráfico de curvas de solutividade (Figura 4.16).

Como era de se esperar, de uma maneira geral a solutividade das xilanases nos fermentados diminui na medida em que a concentração de etanol nestes é aumentada (Tabela 4.15), porém, observa-se uma queda muito mais acentuada quando a concentração de etanol é igual ou maior que 70% v/v. Os resultados para concentrações de etanol igual ou maior que 70% v/v mostram que a queda da solutividade nos experimentos nos quais a semente foi adicionada é maior que no experimento sem a semente (controle) exceto no experimento em que se utilizou BSA como semente. A maior variação da solutividade em relação ao controle foi registrada no experimento com 1,5% da semente 1 adicionada a 48% de etanol, a solutividade neste experimento apresentou queda de até 21% (a 85% de etanol) com média de diminuição de 18% da solutividade nas concentrações de etanol de 70, 80, 85 e 90% v/v. Neste experimento, a solutividade percentual foi de apenas 3,9%, ou seja, apenas 3,9% da atividade xilanásica inicial não foi detectada no precipitado recuperado nestas condições. Por outro lado, os experimentos com semente de BSA não seguiram a tendência dos demais, pelo

Tabela 4.15: Solutividade (S_{lv}) das xilanases na precipitação com etanol do fermentado de *A. niger* com a utilização de semente.

Etanol (%v/v)	Adição a 51% de etanol						Adição a 48% de etanol					
	Controle		Semente 1 - 1,5%		Semente 1 - 3,0%		Semente 1 - 1,5%		Semente BSA - 1,5%		Semente 2 - 1,5%	
	UI.mL ⁻¹	(%)	UI.mL ⁻¹	(%)	UI.mL ⁻¹	(%)	UI.mL ⁻¹	(%)	UI.mL ⁻¹	(%)	UI.mL ⁻¹	(%)
60	9,07±0,03	97,5±0,3	9,19±0,06	96,7±0,6	9,72±0,04	97,2±0,4	8,03±0,02	96,6±0,3				
65	8,20±0,05	88,2±0,5	8,47±0,10	89,2±1,1	8,80±0,18	88,0±1,8	7,41±0,15	89,2±1,4				
70	5,35±0,04	57,5±0,4	4,35±0,16	45,8±1,7	3,81±0,53	38,1±5,3	3,23±0,28	38,9±3,4	6,52±0,62	65,2±6,2	5,18±0,44	50,9±4,3
80	3,44±0,01	37,0±0,1	2,57±0,26	27,0±2,7	2,38±0,29	23,8±2,9	1,76±0,29	21,2±3,5	4,96±0,09	49,6±0,9	1,68±0,38	16,5±3,7
85	2,33±0,44	25,0±4,7	1,43±0,40	15,1±4,2	1,99±0,41	19,9±4,1	0,32±0,37	3,9±4,4	2,24±0,49	22,4±4,9	0,75±0,88	7,4±8,6
90	1,03±0,30	11,1±3,2	–	–	–	–	–	–	0,50±0,21	5,0±2,1	–	–

Experimentos: controle; com semente 1- 1,5% e 3,0% (adição da semente a 51% etanol); semente 1- 1,5%, semente BSA e semente 2- 1,5% (adição da semente a 48% etanol). Condição de precipitação: pH 5,5 a 4,0°C e agitação de 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0°C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Atividade xilanásica inicial: controle, 9,30 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (etanol 51%), 9,50 UI.mL⁻¹; semente 1- 3,0% (etanol 51%), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 1- 1,5% (etanol 48,0%), 8,31 UI.mL⁻¹; semente BSA- 1,5% (etanol 48,0%), 10,00 UI.mL⁻¹; semente 2- 1,5% (etanol 48,0%), 10,18 UI.mL⁻¹. Para a semente BSA e Semente 2 não foram realizados experimentos a 60 e 65% v/v de etanol. Os resultados representados por (–) tiveram valores negativos, o que não têm sentido real.

Tabela 4.16: Efetividade das sementes (η) na precipitação com etanol do fermentado de *A. niger* com a utilização de semente.

Etanol (% v/v)	Adição a 51% de etanol					Adição a 48% de etanol					
	Controle	Semente 1 - 1,5%		Semente 1 - 3,0%		Semente 1 - 1,5%		Semente BSA - 1,5%		Semente 2 - 1,5%	
	S_{iv} (UI.mL ⁻¹)	S_{iv} (UI.mL ⁻¹)	η								
60	9,07	9,19	0,0	9,72	-0,1	8,03	0,11	-	-	-	-
65	8,20	8,47	0,0	8,80	-0,1	7,41	0,10	-	-	-	-
70	5,35	4,35	0,2	3,81	0,3	3,23	0,40	6,52	-0,22	5,18	0,03
80	3,44	2,56	0,3	2,38	0,3	1,76	0,49	4,96	-0,44	1,68	0,51
85	2,32	1,43	0,4	1,99	0,1	0,32	0,86	2,24	0,03	0,75	0,68
90	1,03	-	-	-	-	-	-	0,50	0,51	-	-

Experimentos: controle; com semente 1- 1,5% e 3,0% (adição da semente a 51% etanol); semente 1- 1,5%, semente BSA e semente 2- 1,5% (adição da semente a 48% etanol). Condição de precipitação: pH 5,5 a 4,0°C e agitação de 150 rpm. Etanol adicionado a 5,0°C na vazão de 2,0 mL.min⁻¹. S_{iv} , solutividade das xilanases; η , efetividade da semente, calculada como: $\eta = 1 - (\text{solutividade de xilanase com o uso de semente} / \text{solutividade de xilanase sem o uso de semente})$. Para a semente BSA e Semente 2 não foram realizados experimentos a 60 e 65% v/v de etanol. Os resultados representados por (-), os valores de solutividade foram negativos, portanto, sem sentido real.

contrário, nas concentrações de etanol de 70 e 80% v/v houve aumento na solutividade em relação ao controle e, quando a concentração do precipitante foi elevada para 85 e 90% v/v, as solutividades foram muito próximas às aquelas registradas no controle.

Deve-se destacar ainda outro resultado do experimento com 1,5% da semente 1 adicionada a 48% de etanol. O estudo de Pinheiro et al. (2015), que mostrou uma solutividade de xilanases de *A. niger* dependente da atividade xilanásica inicial no material de partida, sugere a obtenção de menores valores de solutividade para menores atividades xilanásicas iniciais. Assim como esperado, o experimento com 1,5% da semente 1 adicionada a 48% de etanol, no qual a atividade xilanásica inicial ($8,31 \text{ UI.mL}^{-1}$) era menor que nos outros experimentos (9,30 a $10,00 \text{ UI.mL}^{-1}$), foi aquele que registrou os menores valores de solutividade de xilanases nas concentrações de etanol igual ou maiores que 70% v/v. Estes resultados abrem ainda a possibilidade de estudos em valores de atividade enzimática mais elevados, próximos aos utilizados em processos industriais.

Quanto à efetividade do processo de semeadura (η), calculados a partir dos dados de solutividade (S_v), apresentados na Tabela 4.16 mostram que os melhores resultados foram aqueles obtidos nos experimentos a 85% v/v de etanol, utilizando 1,5% da semente 1 ($\eta = 0,86$) e 1,5% da semente 2 ($\eta = 0,68$), em ambos os casos a adição da semente foi realizada a 48% etanol. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados para a solutividade (Tabela 4.15) uma vez que, para o processo de precipitação, quanto menor a solutividade maior é a recuperação de enzimas ativas.

O comportamento comparativo da variação da solutividade nas diferentes condições de precipitação pode ser melhor visualizado na Figura 4.16.

As linhas de tendências lineares dos experimentos com semente apresentam deslocamento em relação ao controle (coeficiente de correlação maior que 0,912), sendo que este deslocamento é mais acentuado quando a concentração de etanol no meio é igual ou maior que 70% v/v. A exceção deste comportamento fica por conta do experimento realizado com semente BSA no qual a linha está acima ou sobreposta à linha referente ao experimento controle.

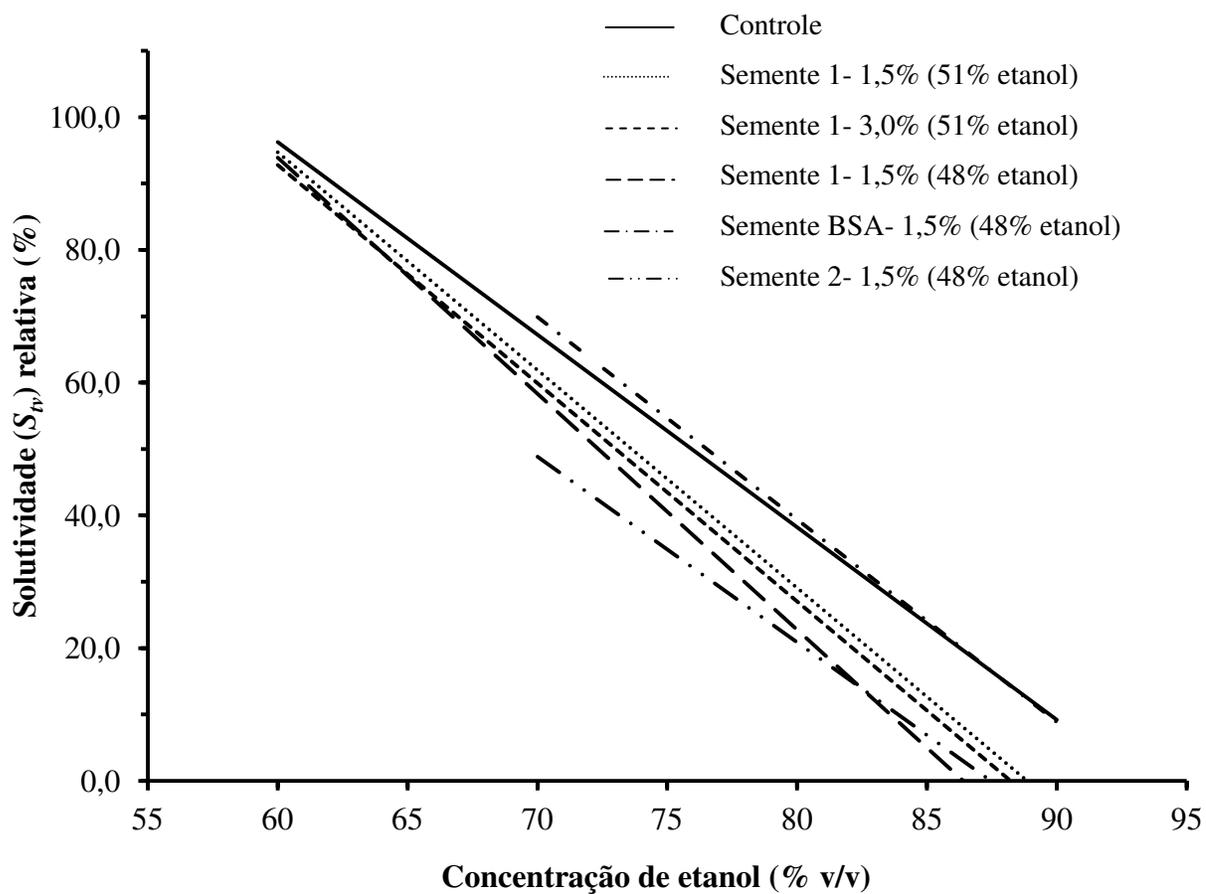


Figura 4.16: Curvas de solutividade de xilanases nos fermentados de *A. niger* nos experimentos controle e com a presença de sementes em função de diferentes concentrações de etanol.

5. DISCUSSÕES GERAIS

Os resultados dos estudos realizados neste trabalho mostraram que complexos enzimáticos de *A. niger* produzidos em FES e FS apresentam diferenças em alguns aspectos. O conteúdo proteico dos fermentados produzidos nos dois sistemas mostraram-se igualmente estáveis à variação temperatura e pH nas faixas estudadas confirmando os relatos da literatura. Na precipitação, a temperatura exerce efeito tanto FES quanto FS, porém, o efeito de pH e concentração de etanol é diferente. As melhores recuperações de xilanases ativas tanto de FES quanto de FS foram obtidas com 85% de etanol a 15,0 °C, pH 5,5 em até 15 min, superaram àqueles relatados em trabalhos de precipitação de xilanases produzidas por *A. niger*. Apesar da concentração de 85% de etanol ainda ser elevada, a recuperação de xilanases por precipitação com etanol apresenta-se como uma alternativa viável com a possibilidade de ser melhorada.

Outro ponto a se destacar é o conceito de solutividade, o qual foi utilizado neste trabalho como ferramenta para prever o máximo de atividade xilanásica possível de ser recuperada em diferentes condições. Além disso, verificou-se que as curvas de solubilidade e de solutividade podem ser utilizadas para a determinação de possível POC (ponto de operação de corte), útil para a projeção de precipitação em etapas.

Finalmente, o uso de semente, muito comum na cristalização de proteínas, utilizado como método alternativo para a precipitação de proteínas apresenta-se como o diferencial deste trabalho. Semente obtida do próprio fermentado teve efeito positivo na precipitação de xilanases ativas dos fermentados com aumentos de até 21% nas recuperações. Assim sendo, a importância desta etapa se dá por ser este o primeiro trabalho com o uso de semente em precipitação de proteínas, abrindo-se a inúmeras possibilidades de estudo de utilização desta técnica como alternativa de aumento do rendimento e pureza dos produtos obtidos por precipitação.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1. Conclusões

1) Os estudos para a seleção do meio de suplementação mostraram o meio descrito por Mandels e Weber (1969) como sendo o mais adequado para a produção de xilanases de *A. niger*, tanto por FES como por FS.

2) Os fermentados de FES e FS foram estáveis (em termos da concentração de proteínas e a atividade de xilanase) nas faixas de temperatura e pH estudadas, permitindo a utilização de valores de temperatura de 15 a 45°C e pH na faixa de 3,4 a 7,6 para os estudos de precipitação de xilanases com etanol.

3) Os estudos de precipitação dos fermentados com etanol mostraram que:

a) Fermentados de FES necessitaram de menor concentração de etanol do que os de FS para a detecção visual de turvação no meio e a cinética preliminar de precipitação com etanol, para FES e FS mostrou ser de 3 h o tempo suficiente para que a precipitação ocorra;

b) Na precipitação pelo planejamento experimental fatorial 2^3 variou-se temperatura, pH e concentração de etanol. Tanto para FES quanto para FS, a temperatura teve efeito negativo sobre a atividade de xilanase. Para a FES a concentração de etanol apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a atividade de xilanase. Em FS, a 95% de confiança nenhuma outra variável apresentou efeito significativo;

c) Na precipitação pelo planejamento experimental composto central 2^2 variou-se pH e concentração de etanol. Nestes estudos, o pH teve efeito significativo para a precipitação de xilanases de FES e de FS. Os resultados obtidos no ponto central foram próximos dos melhores resultados encontrados para precipitação de xilanases de FES e de FS;

d) Segundo o perfil cinético, tanto para FES quanto FS, tempos curtos (até 15 min) são suficientes para a recuperação de toda a atividade xilanásica possível de ser precipitada nestas condições.

4) Os estudos de precipitação em tanque agitado mostraram que:

a) A agitação do sistema e a diminuição da temperatura provocaram a diminuição da concentração mínima de etanol para a turvação visual do meio, quando comparado aos resultados dos experimentos em tubo de ensaio;

b) Tanto a solubilidade aparente (S) quanto a solutividade (S_{iv}) diminuem à medida que a concentração de etanol é elevada. A medida da solutividade mostrou o máximo de atividade enzimática possível de ser recuperada por precipitação com diferentes concentrações de etanol e as curvas de solubilidade aparente e solutividade possibilitou projetar precipitação em etapas;

c) Na precipitação em etapas, as cinéticas de precipitação mostraram ser de 60 min a 65% v/v de etanol o ponto de corte e de 15 min a 90% v/v de etanol a etapa de final de precipitação. O procedimento levou ao enriquecimento de xilanases ativas no precipitado a um fator de purificação de 1,9. Este resultado é 58% superior ao obtido na precipitação direta a 90% de etanol.

5) A técnica de sementeira, muito comum na cristalização de proteínas, foi utilizada neste trabalho e mostrou que:

a) O uso de semente não resultou em grandes variações na precipitação de proteínas totais em relação ao controle, exceto quando foi utilizado semente BSA que resultou na diminuição da concentração de proteínas nos precipitados;

b) Quanto à atividade xilanásica, o uso de semente teve efeito apenas em concentrações de etanol iguais ou maiores que 70%, nos quais aumentos de até 21% em comparação ao controle foram registrados, exceto com a semente BSA;

c) O aumento da massa de semente adicionada não teve efeito sobre a recuperação de atividade xilanásica no precipitado;

d) A recuperação de xilanases ativas aumentou quando a semente 1 foi adicionada à concentração de etanol abaixo do ponto de turvação, evitando a concorrência da semente com núcleos já formados no ponto de turvação;

e) O uso da semente advinda do próprio fermentado mostrou que o efeito não é apenas da presença de partícula ou de uma proteína qualquer; o efeito deve-se à presença de uma partícula com as mesmas características das espécies presentes no fermentado;

Portanto, no presente trabalho constatou-se que fermentados produzidos por *A. niger* produzidos por FES e FS comportam-se de maneira diferente, em termos da recuperação de proteínas totais e da atividade xilanásica, quando precipitados com etanol. Tanto o rendimento quanto a pureza de xilanases desses fermentados podem ser melhorados pela adoção de diferentes estratégias dentre as quais estão: a variação de parâmetros operacionais tais como temperatura, pH, concentração de etanol; a precipitação em etapas baseada na curva de solubilidade e solutividade do fermentado; a técnica de semeadura na qual a utilização de sementes produzidas como precipitados do próprio fermentado.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho mostrou que a recuperação, por precipitação com etanol, de xilanases presentes nos complexos enzimáticos de *A. niger* produzidos em FES e em FS mostra-se bastante promissora. Mostrou ainda a utilização da solutividade como ferramenta de predição do máximo de enzimas ativas a ser precipitada e para a determinação do POC e, finalmente, apresentou de forma inédita, a utilização de semente em precipitação como alternativa para o aumento de rendimento e pureza. Porém, para utilização eficiente dessas técnicas são necessários ainda ajustes na busca principalmente o aumento da recuperação de xilanases ativas e a diminuição da concentração de etanol utilizada. Estes ajustes podem ser conseguidos através de uma série de estudos que visam completar as lacunas ainda existentes, tais estudos incluem:

- a) Realização de experimentos de precipitação com variação de pH, concentração de etanol e faixa de temperatura mais próxima de 0°C, via planejamento experimental;
- b) Estudar de maneira aprofundada a variação da solubilidade e da solutividade das enzimas nos complexos através de experimentos de precipitação com etanol de complexos enzimáticos de FES e FS com diferentes concentrações de proteínas e de atividade xilanásica iniciais;
- c) Aplicar os estudos de precipitação de xilanases com etanol em etapas e com o uso de semente aos complexos enzimáticos produzidos por FES;
- d) Realização de experimentos de precipitação utilizando semente de complexos enzimáticos produzidos por processos diversos;
- e) Realização de experimentos de precipitação utilizando semente, do próprio complexo enzimático, purificada por processos diversos;
- f) Realização de experimentos de precipitação utilizando xilanases comerciais de alta pureza como semente.

Em todos os estudos, realizar os experimentos utilizando complexos enzimáticos com concentrações de enzimas mais elevadas, próximas àquelas usadas em processos industriais.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIRAMI, V.; MEENAKSHI, S. A.; KANTHYMATHY, K.; BHARATHIDASAN, R.; MAHALIGAM, R.; PANNEERSELVAM, A. Partial purification and characterization of an extracellular xylanase from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, p. 117-125, 2011.

AHMAD, Z.; BUTT, M. S.; RIAZ, M. Partial purification and characterization of xylanase produced from *Aspergillus niger* using wheat bran. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 50, p. 433-437, 2013.

AHMED, M. E. Partial purification and characterization of xylanase from *Bacillus cereus* X3. **Journal Baghdad for Science**, v.11, p. 1056-1061, 2014.

ALLAHYAROV, E.; SANDOMIRSKI, K.; EGELHAAF, S. U.; LÖWEN, H. Crystallization seeds favour crystallization only during initial growth. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-9, 2015.

ALVES, F. K. P. **Produção de xilanases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono**. 48 p. TCC (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de ciências biológicas e da Saúde – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2013.

ANDERSEN, M. R.; SALAZAR, M. P.; SCHAAP, P. J.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; CULLEY, D.; THYKAER, J.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BERKA, R. M.; BRAUS, G. H.; STROMEYER, S. A. B.; CORROCHANO, L. M.; DAI, Z.; VAN DIJCK, P. W. M.; HOFMANN, G.; LASURE, L. L.; MAGNUSON, J. K.; MENKE, H.; MEIJER, M.; MEIJER, S. L.; NIELSEN, J. B.; NIELSEN, M. L.; VAN OUYEN, A. J. J.; PEL, H. J.; POULSEN, L.; SAMSON, R. A.; STAM, H.; TSANG, A.; VAN DEN BRINK, J. M.; ATKINS, A.; AERTS, A.; SHAPIRO, H.; PANGILINAN, J.; SALAMOY, A.; LOU, Y.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; GRIMWOOD, J.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P.; MARTINEZ, D.; VAN PEIJ, N. N. M. E.; ROUBOS, J. A.; NIELSEN, J.; BAKER, S. E. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Research**, v. 21, p. 885-897, 2011.

ARAKAWA, T.; KITA, Y.; TINASHEFF, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v. 131, p. 62-70, 2007.

ARAQUE, A. T. M.; MARTÍNEZ, G. D. M.; MUÑOZ, S. S. G.; DIOS, S. E. B.; CORRAL, O. L. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. **Interciencia**, v. 32, p. 780-785, 2007.

ASCHAFFENBURG, R.; FENNA, R. E.; PHILLIPS, D. C. Crystallography of α -Lactalbumin. **Journal Molecular Biology**, v. 67, p. 529-531, 1972.

ASENJO, J. A. **Separation processes in biotechnology**, New York: MARCEL DEKKER, 1990. 329-358.

AVELINO, S. **Recuperação de proteínas por precipitação e flotação: Polieletrólitos e éteres de celulose como precipitantes**. 1997. 172 p. Tese (doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 1997.

BAKALOVA, N.; PETROVA, S.; BENADOVA, R.; KOLEV, D. Isolation of xylanase preparations for biotechnological applications from *Aspergillus niger* A₃. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 9, p. 45-51, 1995.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BAKRI, Y., MASSON, M.; THONART, P. Isolation and Identification of two new fungal strains for xylanase production. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 162, p. 1626-1634, 2010.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56. p. 326-338, 2001.

BELL, D. J.; HOARE, M.; DUNNILL, P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 26, p. 1-72, 1983.

BENEDETTI, A. C. E.; COSTA, E. D.; ARAGON, C.C.; SANTOS, A. F.; GOULART, A. J.; ANGELIS, D. A.; Rubens MONTE, R. Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 1, p. 25-31, 2013.

BERGFORS, T. Seeds to crystals. **Journal of Structural Biology**, n. 142, p. 66-76, 2003.

BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 819-824, 2009.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C.; GNANSOUNOU, E. Editors: **Biofuels**, Burlington: Academic Press, 2011, p. 229-250.

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

BLOW, D. M.; BODO, G.; ROSSMAN, M. G.; TAYLOR, C. P. S. Crystalline forms of cytochrome C. **Journal Molecular Biology**, v. 8, p. 606-609, 1964.

BRADFORD, M. M. A rapid end sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRECCIA, J. D.; SÍÑERIZ, F.; BAIGORI, M. D.; CASTRO, G. R.; HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 42-49, 1998.

BUCHACHER, A.; IBERER, G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma-aspects of yield and virus safety. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 148-163, 2006.

BYRNE, E. P.; FITZPATRICK, J. J. Investigation of how agitation during precipitation, and subsequent processing affects the particle size distribution and separation of α -lactalbumin enriched whey protein precipitates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 17-25, 2002.

CARBONE, N. M.; JUDGE, R. A.; ETZEL, M. R. Evaluation of a model for seeded isothermal batch protein crystallization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, p. 84-90, 2005.

CARBONE, M. N.; ETZEL, M. R. Seeded isothermal batch crystallization of lysozyme. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, p. 1221-1224, 2006.

CARDOSO, I. C.; PEREIRA, K. C.; SILVA, N. K. G.; BARBOSA, R. C.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U. C. **Fermentação do soro do leite por *Aspergillus niger* para produção enzimática**. 4ª Semana do servidor e 5ª Semana Acadêmica, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

CARMONA, E. C.; BROCHETTE-BRAGA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; JORGE, J. A. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 166, p. 311-315, 1998.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 183-188, 2003.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CAYEY, N. W.; ESTRIN, J. Secondary nucleation in agitated, magnesium sulfate solutions. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals Journal**, v. 6, p. 13-20, 1967.

CHIPETA, Z. A.; PREEZ, J. C.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. **Applied Microbiololy and Biotechnology**, v. 69, p. 71-78, 2005.

CHRISTOPHER, G. K.; PHILIPPS, A. G.; GRAY, R. J. Temperature-dependent solubility of selected proteins. **Journal of Cristal Growth**, v. 191, p. 820-826, 1998.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, p. 3342, 2001.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, p. 459-475, 1946.

COHN, E. J.; GURD, F. R. N.; SURGENOR, D. M.; BARNES, B. A.; BROWN, R. K.; DEROUAUX, G.; GILLESPIE, J. M.; KAHNT, F. W.; LEVER, W. F.; LIU, C. H. MITTELMAN, D.; MOUTON, R. F.; SCHMID, K.; UROMA, E. A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separations of the protein components of humam plama. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, p. 465-474, 1950.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **Federation of European Microbiological Societies-Microbiology Reviws**, v. 29, p. 3-23, 2005.

CORTEZ, E. V.; PESSOA JR, A.; ASSIS, A. N. Xylanase recovery by ethanol and Na₂SO₄ precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, p. 661-666, 1998.

CORTEZ, E.V.; PESSOA JR, A. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry** v. 35, p. 277-283, 1999.

CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**, v. 796, p. 48-54, 2013.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H. Purification and characterization of transglutaminase from anewly isolated *Streptomyces hygrosopicus*, **Food Chemistry**. v. 105, p. 612-618, 2007.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

CURLING, J. M. **Methods of Plasma Protein Fractionation**, Academic Press, New York, 1980.

CUYVERS, S.; DORNEZ, E.; REZAEI, M. N.; POLLET, A.; DELCOUR, Jan. A.; COURTIN, C. M. Secondary substrate binding strongly affects activity and binding affinity of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* GH11 xylanases. **FEBS Journal**, v. 278, p. 1098-1111, 2011.

D'ARCY, A.; VILLARD, F.; MARSH, M. An automated microscaled matrix-screening method for protein crystallization. **Acta Crystallographica Section D – Biological Crystallography**, v. 63, p. 550-554, 2007.

DHIMAN, S. S.; SHARMA, J.; BATTANA, B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources**, v. 3, p. 1377-1402, 2008.

DO, T. T.; QUYEN, D. T.; NGUYEN, T. N.; NGUYEN, V. T. Molecular characterization of the glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, v. 92, p. 196-202, 2013.

DOLMA, S.; SHARMA, N.; PATHANIA, S. Cost effective production and partial purification of cellulase (CMCase, FPase and glucosidase) and xylanase on soft and hard wood waste from *Alternaria alternata*. **International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, p. 1-7, 2014.

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

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457 - 462, 2008.

ELLIAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 615-620, 2002.

ESTEBAN, R.; VILLANUEVA, J. R.; VILLA, T. G. β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 733-739, 1982.

FADEL, M. High-level xylanase production from sorghum flour by a newly isolate of *Trichoderma harzianum* cultivated under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 51, p. 61-78, 2001.

FADEL, M.; KEERA, A. A.; ABDEL-AZIZ, S. M.; KAHIL, T. Clean production of xylanase from white corn flour by *Aspergillus fumigates* F-993 under solid state fermentation. **World Applied Sciences Journal**, v. 29, p. 326-336, 2014.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular catalysis B: enzymatic**, v. 49, p. 36-42, 2007.

FARINAS, C. S.; SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BELUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 1-10, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York : Waster & Grugter, 1984. 613p.

FOUNIER, R. A.; FREDERICK, M. M.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and Characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. III. An enzyme of pl 3.65. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 27, p. 539-546, 1985.

FREDERICK, M. M.; FREDERICK, J. R.; FRATZKE, A. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of xylobiose- and xylose-producing endo-xylanase from *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Research**, v. 97, p. 87-103, 1981.

FREDERICK, M. M.; KIANG, C. H. FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. 1. Two isozymes active on xylan, Backbones near branch points. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 525-532, 1985.

FUJIMOTO, H. OOI, T.; WANG, S. L.; TAKIZAWA, T.; HIDAKA, H.; MURAO, S.; ARAI, M. Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 538-540, 1995.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its applicaton. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87. p. 511-519, 1999.

GERVAIS P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2. p. 257-268, 1987.

GHOSH, R. **Principles of Bioseparations Engineering**, World Scientific Publishing Co. Singapore, 2006.

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

GIULIETTI, M.; SECKLER, M. M.; DERENZO, S.; RÉ, M. I.; CEKINSKI, E. Industrial crystallization and precipitation from solutions: State of technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. ,2001.

GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. D.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEI, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Tecnology**, v. 78, p. 261-265, 2011.

GOMES, C. A. O. **Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semisólido por *Aspergillus niger* 3T5B8**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1995. Dissertação de Mestrado Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

GONZÁLEZ, G. V.; TORRES, E. F.; AGUILAR, C. N.; GOMES, S. J. R.; GODÍNEZ, G. D.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1-11, 2002.

GORBACHEVA, I. V.; RODIONOVA, N. A. Studies on xylan degrading enzymes: I. Purification and characterization of endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* STR. 14. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 484, p. 79-93, 1977.

GREGORY, J. Flocculation of polystyrene particles with cationic polyelectrolytes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 65, p. 2260-2268, 1969.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F.F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **SpringerPlus Journal**, v. 2, p. 1-7, 2013.

GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, n. 88, p. 325-334, 2000.

GUPTA, A.; GUPTA, V. K.; MODI, D. R.; YADAVA, L. P. Production and Characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology**, v. 7. p. 551 - 556, 2008.

HAULI, I.; SARKAR, B.; MUKHERJEE, T.; KANTI, S.; MUKHOPADHYAY, S. K. Purification and characterization of a thermoalkaline, cellulase free thermostable xylanase from a newly isolated *Anoxybacillus* sp. Ip-C from hot spring of Ladakh. **Research in Biotechnology**, v. 4, p. 30-43, 2013.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100. P. 10-18, 2009.

INOUE, H.; TIMASHEFF, S. N. Preferential and absolute interactions of solvent components with proteins in mixed solvent systems. **Biopolymers**, v. 11, p. 737-743, 1972.

INAGAKI, K.; NAKAHIRA, K.; MUKAI, K.; TAMURA, T.; TANAKA, H. Gene cloning and characterization of the acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 1061-1067, 1998.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 5, p. 7-11, 2012.

- JANSON, J. C.; LARS, R. **Protein Purification**, New York: VCH Publishers, Inc., 1989. 10-24.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. **Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore do conhecimento agroenergia**. Embrapa Informática Agropecuária, Campinas-SP, 2009, 28 p.
- JEFFRIES. T. W. **Biodegradation of lignin and hemicelluloses**. In: Biochemistry of Microbial Degradation, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, p. 233-277, 1994.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1219-1227, 2012.
- KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization o xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 505-511, 1998.
- KANWAR, S. S.; DEVI, S. Thermostable xylanases of microbial origin: Recent insights and biotechnological potential. **The International Journal of Biotechnological**, v. 1, p. 1-20, 2013.
- KARPINSKI, P. H.; WEY, J. S. **Precipitation Processes**. In: Handbook of Industrial Crystallization. By MYERSON, A. S. – 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Boston, Ma (2002). p. 141-160, 2002.
- KASPER, R. **Theoretical and experimental investigation of the flocculation of charged particles in aqueous solutions by polyelectrolytes of opposite charge**, PhD Thesis, Califomia Institute of Technology, Pasadena, CA, 1971.
- KESKER, S. S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces* T7: Cultural conditions and enzyme properties. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 481-486, 1992.
- KILIKIAN, B. V; PESSOA JR., A. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005.
- KIMURA, I.; SASAHARA, H.; TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 334-339, 1995.
- KITAMOTO, N.; YOSHINO, S.; OHMIYA, K.; TSUKAGOSHI, N. Sequence analysis, overexpression, and antisense inhibition of a b-xylosidase gene, xylA, from *Aspergillus oryzae* KBN616. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 20-24, 1999.
- KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using Brewer's spent grain as substrate. **BioMed Research Internationa**, v. p. 1-8, 2013.

KORMELINK, F. J. M.; LEFEBVRE, B.; STROZYK, F.; VORAGEN, A. G. J. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 267-282, 1993.

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

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v 227, p. 680-685, 1970.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 121, p. 1081-1100, 2005.

LEVASSEUR, A.; ASTHER, M. RECORD, E. Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 51, p. 177-183, 2005.

LI, X.; ZHANG, Z.; JEFFREY F. D. D.; KARL, E. L. E.; LJUNGDAHL, L. S. G. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3212-3218, 1993.

LIDE, D. R. **Physical Constants of Organic Compounds**, In: CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, LIDE, D. R. ed., <<http://www.hbcpnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.

LIN, J.; PILLAY, B.; SINGH, S. Purification and biochemical characteristics of β -D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*_SSBP. **Biothechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, p. 81-87, 1999.

LIU, T.; HE, Z.; HU, H.; NI, Y. Treatment of APMP pulping effluent based on aerobic fermentation with *Aspergillus niger* and post-coagulation/flocculation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4712-4717, 2011.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. L.; RODRÍGUEZ, J.; BALL, A. S.; COPA-PATIÑO, J. L.; PÉREZ-LEBLIC, M. I.; ARIAS, M. E. Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM2 from *Streptomyces chattanoogensis* CECT 3336. **Applied Microbiology and Biothechnology**, v. 50, p. 284-287, 1997.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006, 129 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

MAHILRAJAN, S.; BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Effect of selected polyols and salts on stability of xylanase produced by *Bacillus pumilus*. **Proceedings of Jaffna university International Research Conference**, 2014.

- MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Re/View Environmental Science & Bio/Technology**, v 1, p. 105-114, 2002.
- MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p. 693-702, 2004.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MARCUS, Y.; HEFTER, G. Ion pairing. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 4585-4621, 2006.
- MARIÑO, M. A.; FREITAS, S.; MIRANDA, E. A. Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases by *Trichoderma harzianum* P49P11. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 325-333, 2015.
- MATSUMOTO, Y.; CASTAÑEDA, G. S.; REVAH, S.; SHIRAI, K. Production of β -*N*-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 665-671, 2004.
- MATSUSHITA, J.; KATO, Y.; MATSUDA, K. Purification and Properties of an α -D-xylosidase from *Aspergillus niger*. **The Journal of Biochemistry**, v. 98, p. 825-832, 1985.
- MELIA, T. P.; MOFFITT, W. P. Crystallization from aqueous solution. **Journal of Colloid Science**, v. 19, p. 433-447, 1964.
- MELO, G. R. **Produção de celulasas e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos**. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Programa de Pós-Graduação em biologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; SILVA, T. M.; JORGE, A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 33, p. 813-821, 2010.
- MIELLENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 324-329, 2001.
- MILALA, M. A.; NOK, A. J.; INUWA, H. M.; IBRAHIM, S. Purification and characterization of a xylanase from *Aspergillus flavus* for possible use in paper industry. **ARPN Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 1090-1104, 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

- MING, X. Q.; YAO, S. J.; GUAN, Y, X. Novel isoelectric precipitation of proteins in a pressurized carbon dioxide-water-ethanol system. **Biotechnology Progress**, v., 20. p. 1176-1182, 2004.
- MIRÓN, J.; VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Joint effect of nitrogen and phosphorous on glucose oxidase production by *Aspergillus niger*: Discussion of an experimental design with a risk of co-linearity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 54-63, 2008.
- MOROSOLI, R.; ROY, C.; YAGUCHI, M. Isolation and partial primary sequence of a xylanase from the yeast *Cryptococcus albidus*. **Biochimica et biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and molecular Enzymology**, v. 870, p. 473-478, 1986.
- MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. (2013) A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. 1ed. Rijeka: InTech, 2013, v. 10, p. 251-275.
- MULLIN, J. W. **Crystalization**, 4th Ed, Butterworth-Heinemann, Oxford, England. 2001.
- MYERSON, A. S. **Handbook of Industrial Crystallization**, Butterworth-Heinemann, Boston, 2002.
- NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. , p. 82-86, 2008.
- NAKADAI, T.; NASUNO, S. Enzyme preparation from extract of wheat bran Koji by alcohol precipitation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, p. 253-257, 1989.
- NIELSEN, A. E. **Kinetics of Precipitation**, Pergamon Press, Oxford, England, 1964.
- OH, H.; LEE, J. Y.; KIM, M. K.; UM, I. C.; LEE, K. H. Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 32-37, 2011.
- OSS, C. J. On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. **Journal of Protein Chemistry**, v. 8, p. 661-668, 1989.
- PAL, A.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Purification and immobilization of na *Aspergillus terreus* xylanase: use of continuous fluidized bed column reactor. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 163-168, 2006.
- PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 189 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2003.

PANAGIOUTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 37-45, 2003.

PANDEY, A., RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbiology Technology**, 14: 486-488, 1992.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PINHEIRO, M. J.; COSTA, M. A. L.; FREITAS, S.; FARINAS, C. S.; FILHO, P. A. P.; MIRANDA, E. A. Estudo sobre a relação entre o equilíbrio de fases na precipitação de enzimas e recuperação de atividade: O conceito de solutividade. **VIII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada**, Aracaju – Se, 2015.

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

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

POLIZELI, M. L. T. M. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: **Advances in Fungal Biotechnology**, v. 40, p. 82, 2009.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-22, 1998.

RAJ, K. C.; CHANDRA, T. S. Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn 1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 457-461, 1996.

RODIONOVA, N. A.; DUBOVAIA, N. V.; ENEISKAIA, E. V.; MARTINOVICH, L. I.; GRACHEVA, I. M.; BEZBORODOV, A. M. Purification and characteristic of endo-(1,4)-beta-xylanase from *Geotrichum candidum* 3C. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 36, p. 535-540, 2000.

RODIONOVA, N. A.; TAVOBILOV, I. M.; BEZBORODOV, A. M. beta-xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. **Journal of Applied Biochemistry**. v. 5, p. 300-312, 1983.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, Campinas-SP, 2005.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 197 p. Tese

(Doutorado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RODRÍGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.46, p.912-919, 2011.

ROY, N.; ROWSHANUL, H. M. Isolation and characterization of xylanase producing strain of *Bacillus cereus* from soil. **Iranian Journal Microbiology**, v. 1, p. 49-53, 2009.

RUEHRWEIN, R. A.; WARD, A. Mechanism of clay aggregation by polyelectrolytes, **Soil Science**, v. 73, p. 485-492, 1952.

SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, p. 1973-1978, 2008.

SARIDAKIS, E.; DIERKS, K.; MORENO, A.; DIECKMANN, M. W. M.; CHAYENA, N. E. Separating nucleation and growth in protein crystallization using dynamic light scattering. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 58, p. 1597-1600, 2002.

SCOPES, R. K. **Protein purification**. 2ª Edição. Springer-Verlag, New York, 1987.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; van DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SHAO, W.; OBI, S. K. C.; PULS, J.; WIEGEL, J. Purification and characterization of the α -glucuronidase from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JWISL-YS485, an important enzyme for the utilization of substituted xylans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1077-1081, 1995.

SHEI, J. C.; FRATZKE, A. R.; FREDERICK, M. M.; FREDERICK, J. R.; REILLY, P. J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. II. An Enzyme of pI 4.5. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 533-538, 1985.

SILVA, C. H. C.; PULS, J.; SOUSA, M. V. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Review of Microbiology**, v. 30, p. 114-119, 1999.

SOARES, P. A. G.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA JR, A.; CUNHA, M. G. C. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 389-395, 2012.

SOHNEL, O.; GARSIDE, J. **Precipitation: basic principles and industrial applications**. Butterworth-Heinemann, Oxford, England. 1992.

SOUZA, R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semisólida utilizando resíduo do maracujá como substrato.** 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Centro de Ciências e Tecnologia – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2008.

SRIVASTAVA, G. P.; VARSHNI, Y. P. Variation of dielectric constant with temperature. **Physica**, v. 22, p. 584-586, 1956.

STRICKER, A. R.; MACH, R. L.; GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulase-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 211-220, 2008.

STURA, E.; WILSON, I. Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 110, p. 270-282, 1991.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

TÉLLEZ, J. A.; ARANA, C. A.; GONZÁLEZ, B. A. E.; VINIEGRA, G. G.; LOERA, O. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 665-669, 2006.

TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 566-574, 1992.

THALLER, C.; WEAVER, L.; EICHELE, G.; WILSON, E.; KARLSSON, R.; JANSONIUS, J. Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 147, p. 465-469, 1981.

TSCHELIOESSNIG, A.; SATZER, P.; HAMMERSCHMIDT, N.; SCHULZ, H.; HELK, B.; JUNGBAUER, A. Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. **Journal of Biotechnology**, v. 188, p. 17-28, 2014.

TURNBULL, D.; VONNEGUT, B. Nucleation Catalysis. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 44, p. 1292-1298, 1952.

UCHIDA, H.; KUSAKABE, I.; KAWABATA, Y.; ONO, T.; MURAKAMI, K. Production of xylose from xylan with Intracellular Enzyme system of *Aspergillus niger* 5-16. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, p. 153-158, 1992.

VARMA, R. J.; NENE, S.; BALIGA, B. A.; ELIAS, C. Studies on commercial aspects of xylanase from *Chainia* species. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 58, p. 878-882, 1999.

VIJAYALAKSHMI, S.; RANJITHA, J.; RAJESWARI, V. D. Characterization and catalytic property of xylan degrading enzyme from microbial source. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, p. 25-28, 2013.

VITCOSQUE, G. L.; RODRIGUEZ- ZÚÑIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Comparação da hidrólise de bagaço de cana explodido por dois complexos enzimáticos derivados de materiais lignocelulósicos. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Búzios – Rio de Janeiro, 2012.

WATEEWUTHAJARN, K.; PINPHANICHAKARN, P. Purification and characterization of xylanases from *Streptomyces* sp. PC22. **Journal Science Resource of the Chulalongkorn University**, v. 25, p. 245-258, 2000.

XIMENES, F. A.; SOUSA, M. V.; PULS, J.; SILVA, F. G. J.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, p. 18-21, 1999.