



**CARACTERIZAÇÃO QUERATINOLÍTICA, XILANOLÍTICA E
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR
CULTURAS DE *Trichosporon***

ODACY CAMILO DE SOUZA

**RECIFE
FEVEREIRO/2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**CARACTERIZAÇÃO QUERATINOLÍTICA, XILANOLÍTICA E
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR
CULTURAS DE *Trichosporon***

ODACY CAMILO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia aplicada

Orientador: Oliane Maria Correia

Co-orientador: Cristina Maria de Souza-Motta

RECIFE

FEVEREIRO/2010

Souza, Odacy Camilo de

Caracterização queratinolítica, xilanolítica e otimização da produção de xilanases por culturas de Trichosporon/ Odacy Camilo de Souza. – Recife: O Autor, 2011.

77 folhas: il., fig, tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia.

Co-orientadora: Cristina Maria de Souza-Motta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Micologia Aplicada, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Basidiomicetos 2. Fungos- enzimas 3. Fungos-culturas e meios de cultura I. Título.

579.59

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-146

**CARACTERIZAÇÃO QUERATINOLÍTICA, XILANOLÍTICA E
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR
CULTURAS DE *Trichosporon***

ODACY CAMILO DE SOUZA

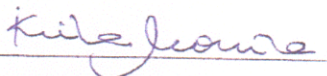
Data da defesa: 19 de fevereiro de 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

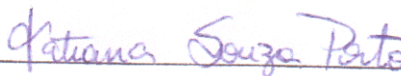
MEMBROS TITULARES



Dra. Oliane Maria Correia Magalhães – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco



Drª. Keila Aparecida Moreira
Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco



Drª. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico
de fazer as dificuldades desaparecerem
e os obstáculos sumirem.”

(John Quincy Adams)

DEDICATÓRIA

*A minha filha Letícia,
Ao meu marido Osnir Viana pelo seu
apoio, paciência e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em nome do Departamento de Micologia, que propiciou condições para realização do presente trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela disponibilidade dos laboratórios. A todos que fazem parte do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto.

A Profa. Dra. Oliane Magalhães, orientadora científica, pelo constante incentivo, paciência, sabedoria sempre demonstrados.

A Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela assessoria técnico-científica, pelo carinho e conhecimentos transmitidos.

A Profa. Dra. Tatiana Souza Porto, pela contribuição nas análises estatísticas dos resultados.

Em especial à Minelle Sousa, pelo apoio, incentivo e amizade mais direta durante todas as etapas deste trabalho.

As amigas de todas às horas Roberta Cruz e Nadja Lopes, pelo apoio e incentivo, sempre demonstrados em qualquer situação.

A Esthefânia Genú, Tatiane Leite, Liana Lins, Marília Maciel, Suzane Cheng, Paula Daniele, Bill Amaral, Katarina Melo e aos demais colegas da pós-graduação em Micologia, pelos momentos de descontração.

A Eliane Nogueira, técnica da Micoteca URM, por sua amizade, alegria, e pelo apoio, indispensáveis para realização deste trabalho.

Aos colegas da Micoteca e da Imunologia, pela compreensão e apoio em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Caracterização queratinolítica, xilanolítica e otimização da produção de xilanases por culturas de *Trichosporon*

Trichosporon são leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota, algumas espécies são destacadas na atividade proteolítica, xilanolítica dentre outras enzimas. Os objetivos deste estudo foram verificar a viabilidade, autenticar a taxonomia, caracterizar quanto à capacidade queratinolítica e/ou queratinofílica em meio sólido e cultivo submerso, selecionar isolados em meio sólido e em fermentação por cultura submersa para a produção de xilanases e otimizar as condições de produção de xilanases em culturas de *Trichosporon* preservados sob óleo mineral na Micoteca URM. Foram realizadas a reativação e autenticação das culturas através das características morfofisiológicas. Para caracterização queratinolítica e/ou queratinofílica e xilanolítica foram utilizados como substratos penas de aves e xilana em meio sólido e no cultivo submerso foram utilizados como fontes de carbono penas de aves e xilose respectivamente. Para determinação das melhores condições de produção de xilanases foi realizado planejamento fatorial completo (2^4). Das 22 amostras mantidas na Micoteca URM, 91% permaneceram viáveis e foram autenticadas confirmando a espécie depositada. Os vinte isolados viáveis foram capazes de colonizar as penas, apresentando atividade queratinofílica. Em meio sólido, todas as culturas apresentaram crescimento, sem presença de halo de degradação, contudo em cultivo submerso, todas as culturas apresentaram atividade queratinolítica, sendo *T. aquatile* URM4440 com 2,65 U/mL o melhor produtor que apresentou atividade ótima em pH 8,6 a 40°C. Na detecção da atividade xilanolítica, 12 culturas apresentaram halo de degradação, sendo selecionadas para teste em cultivo submerso. Em meio líquido, o isolado *T. cutaneum* URM4789 com 24,25 U/mL foi o melhor produtor, o qual apresentou atividade ótima em pH 6,0 a 60°C, sendo selecionado para otimização das condições de produção de xilanases. O melhor resultado das condições de produção da atividade xilanolítica foi obtido no ensaio 13, nas seguintes condições: tempo de 96 horas; concentração de xilose 1,5%; ausência de extrato de levedura; pH 7,0 e temperatura 27°C, nessas condições 65,15 U/mL de atividade enzimática foi obtida. As variáveis, concentração de xilose, temperatura e o pH mostraram efeito significativo sobre a produção de xilanases. Dentre as espécies avaliadas, *T. aquatile* URM4440 e *T. cutaneum* URM4789 apresentaram os melhores resultados quanto às atividades queratinolíticas e xilanolíticas respectivamente.

Palavras-chave: *Trichosporon* sp.; atividade enzimática, queratinases e xilanases

ABSTRACT

Keratinolytic and xylanolytic screening and optimization of xylanase production by *Trichosporon* preserved cultures

Trichosporon are yeasts belonging to the phylum Basidiomycota, with some species highlighted in the proteolytic activity, among other xylanolytic enzymes. The objectives of this study was to determine the feasibility, to endorse the taxonomy, to characterize the ability *Malassezia* and / or keratinophilic in solid and submerged cultivation, selecting isolates on solid medium and submerged culture fermentation for the production of xylanases and optimize the conditions for production of xylanases in cultures of *Trichosporon* preserved under mineral oil at the URM Culture Collection. Were performed reactivation and authentication of cultures through the physical and physiological characteristics. The characterization keratinophilic and / or keratinolytic and xylanolytic were used as substrates feathers and xylan in solid and submerged cultivation were used as carbon sources feathers and xylose respectively. To determine the best conditions of production was carried xylanolytic complete factorial design (24). Of the 22 samples stored in the URM Culture Collection, 91% remained viable and were authenticated confirming the species deposited. Twenty isolates viable were able to colonize the feathers, giving keratinophilic activity. In solid medium, all cultures showed growth, without the presence of halo of degradation, but in submerged cultivation, all cultures showed keratinolytic activity, and *T. aquatile* URM4440 with 2.65U/ mL the best producer that had optimum activity at pH 8.6 at 40°C. The detection of xylanolytic activity, 12 crops had halo of degradation, being selected for testing in submerged cultivation. In liquid medium, the isolated *T. cutaneum* URM4789 with 24.25 U / mL was the best producer, which showed optimal activity at pH 6.0 at 60°C, was selected to optimize the conditions for production of xylanases. The best result of the conditions of production of xylanolytic activity was determined in the test 13, the following conditions: time 96 hours, the concentration of xylose 1.5%, absence of yeast extract, pH 7.0 and temperature 27°C, these conditions 65.15U/ mL of enzyme activity was obtained. The variables, xylose concentration, temperature and pH showed significant effect on the production of xylanases. Among the species evaluated, *T. aquatile* URM4440 and *T. cutaneum* URM4789 showed the best results regarding keratinolytic activities and xylan respectively.

Keywords: *Trichosporon* sp. Enzymatic activity, keratinases and xylanases

Lista de figuras

Fundamentação teórica	Pág.
Figura 1 - Fragmento da estrutura química da queratina (alfa hélice). Ligações em vermelho são pontes de hidrogênio. As ligações amida são os sítios de ataque das queratinases (Creighton, 1989).....	18
Figura 2 - Estrutura da xilana e sítios de ataque por enzimas xilanolíticas (Collins <i>et al.</i>).....	22
 Capítulo 1	
Figura 1 - Aspectos microscópicos de penas inoculadas com suspensão de <i>Trichosporon cutaneum</i> URM4251 após 10 (a), 20(b) e 30 (c) dias.....	36
Figura 2. Determinação da atividade queratinolítica de espécies de <i>Trichosporon</i>	38
Figura 3. Efeito do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade queratinolítica (U/mL) do isolado de <i>T. aquatile</i> URM4440.....	39
 Capítulo 2	
Figura 1. Atividade xilanolítica, pH do extrato bruto e biomassa de espécies de <i>Trichosporon</i> após 5 dias de fermentação em cultivo submerso.....	49
Figura 2. Efeito do pH (a) e da temperatura (b) na atividade xilanolítica (U/mL) do isolado de <i>T. cutaneum</i> URM4789.....	50
 Capítulo 3	
Figura 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 48h de cultivo.....	59
Figura 2 - Gráfico de interpretação geométrica dos efeitos da interação entre as concentrações de xilose e de extrato de levedura com 48h de cultivo	60
Figura 3 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 72h de cultivo.....	61
Figura 4 - Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração de extrato de levedura e temperatura) tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica.....	62
Figura 5 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 96h de cultivo.....	63

Lista de quadros e tabelas

	Pág.
Capítulo 1	
Quadro 1- Caracterização de espécies de <i>Trichosporon</i> preservadas sob óleo mineral, para avaliar a capacidade queratinofílica e queratinolítica, pelo crescimento e degradação de penas de aves contidas em placas a 28 °C, e 37 °C, durante 30 dias.....	36
Capítulo 2	
Quadro 1 - Avaliação da capacidade de degradação de xilana por espécies de <i>Trichosporon</i> , pelo crescimento ágar-xilana nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, em BOD durante 7 dias.....	48
Capítulo 3	
Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de xilanases por <i>Trichosporon cutaneum</i> URM4789.....	56
Tabela 2 - Resultados do planejamento experimental para a produção xilanolítica por fermentação submersa (FS) com <i>Trichosporon cutaneum</i> URM4789.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Coleção de culturas.....	15
2.2. Preservação de microrganismos.....	15
2.3. Preservação sob óleo mineral.....	16
2.4. Proteases.....	17
2.5. Queratinases e atividade queratinofílica e queratinolítica.....	17
2.6. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos.....	19
2.7. Xilanases e atividades xilanolíticas.....	21
2.8. Importância do gênero <i>Trichosporon</i>	24
2.9. Fermentação submersa.....	26
3. Capítulo I: Artigo – Viabilidade, autenticação taxonômica e caracterização queratinofílica e queratinolítica de culturas preservadas de <i>Trichosporon</i> da Micoteca URM.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
Resultados e discussão.....	35
Conclusões.....	40
4. Capítulo II: Artigo – Seleção de culturas de <i>Trichosporon</i> da Micoteca URM quanto a produção de xilanases e caracterização parcial da enzima.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
Resultados e discussão.....	47
Conclusões.....	51
5. Capítulo III: Artigo – Produção de xilanases por <i>Trichosporon cutaneum</i> URM 4789.....	52
Resumo.....	53
Introdução.....	55
Material e métodos.....	56
Resultados e discussão.....	57
Conclusões.....	64
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Coleção de culturas constitui um centro de conservação de recursos genéticos responsável pela coleta de organismos relevantes para estudos científicos, pela oferta de serviços de identificação, depósito, preservação e distribuição, além de oferecer consultoria e treinamento para formação de recursos humanos (Smith e Onions, 1994; Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*, 2004).

O principal objetivo da preservação de cepas fúngicas é a manutenção das características biológicas dos isolados. A conservação dos aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e metabólicos dessas cepas é frequentemente requerida para estudos de taxonomia, perfil bioquímico, diagnóstico laboratorial e produção de substâncias de interesse comercial e industrial (Neufeld e Oliveira, 2008).

Para garantir a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, são utilizados métodos de preservação que têm basicamente o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular. Dentre os mais utilizados, pode-se citar: subcultivos sucessivos, estocagem sob óleo mineral, em água destilada esterilizada, solo ou areia, sílica-gel, nitrogênio líquido, liofilização e congelamento (Smith e Onions, 1994; Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*, 2004).

De acordo com Alexopoulos *et al.* (1996) os fungos são microrganismos eucariontes, com parede celular constituída por polissacarídeos, principalmente quitina, e também por glicoproteínas. Podem ser pluricelulares (fungos filamentosos) ou unicelulares (leveduras). As leveduras são fungos reconhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica, são predominantemente unicelulares, na maioria sapróbias, algumas parasitas ou oportunistas (Lachance e Starmer, 2008). Encontradas em diversos substratos naturais, matéria orgânica em decomposição, ar, água doce e salgada e solo. Podem ser isoladas ainda da pele e de outros tecidos animais, em latência, causando doenças ou como sapróbias (Bentubo *et al.*, 2008).

As leveduras compreendem um grupo de microrganismo com morfologia diversa. Filogeneticamente são heterogêneas e estão inseridas em várias divisões, desde os fungos imperfeitos, até os Ascomycota e Basidiomycota. Reproduzem-se sexuadamente por ascosporos ou basidiosporos e assexuadamente por brotamento, ou a combinação desses processos. A macroscopia caracteriza-se pela presença de colônias com formas, cores e texturas variadas; caracterizam-se por apresentar em sua micromorfologia, blastoconídios

e alguns gêneros como *Trichosporon* apresentam pseudo-hifas que se fragmentam originando artrosporos (Barnett *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002).

Espécies de *Trichosporon* podem ser encontradas isoladas de solo, amostras de água, vegetais, aves e mamíferos. É citado como agente causador de infecções superficiais e profundas nos seres humanos, no entanto é um membro da microbiota normal da boca, pele e unhas, de animais incluindo os seres humanos (Ellner *et al.*, 1993).

Este gênero de levedura tem sido largamente utilizado em processos biotecnológicos para produção de diversas enzimas, lipases, celulasas, proteases e xilanases. Entretanto não foram encontradas na literatura pesquisas com estes fungos, quanto à produção de queratinases, enzimas necessárias para a degradação dos tecidos queratinizados, como a pele e unhas (Liu *et al.*, 1998; Silva-Neves *et al.*, 2006).

Enzimas proteolíticas constituem um importante grupo de enzimas comerciais, com ampla aplicação nas indústrias de detergentes, alimentos e couro (Kumar *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002). As queratinases constituem uma classe particular de enzimas proteolíticas capazes de degradar queratina. São utilizadas na hidrólise de queratinas e uma quantidade significativa de proteínas fibrosas insolúveis em água, na forma de penas, cabelos, unhas, chifres e outros substratos disponíveis no processo agroindustrial (Onifade *et al.*, 1998). Outra classe de enzimas de interesse comercial são as xilanases, utilizadas no branqueamento de papel, como auxiliar na extração de óleos vegetais, clarificação de sucos e vinhos, na produção de protoplastos para uso em engenharia genética, entre outros (Biely, 1993; Seyis e Aksoz, 2005).

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar e quantificar atividade queratinofílica, queratinolítica e xilanolítica, em culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM, e determinar as condições de produção de xilanases.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Coleções de culturas

As coleções de materiais biológicos vão de pequenos centros privados a grandes centros de serviço, parte essencial da infra-estrutura de apoio às ciências da vida e à biotecnologia, tendo como objetivo principal prover ao usuário os produtos e/ou serviços oferecidos por meio de técnicas e processos que certifiquem a qualidade e que estejam de acordo com as leis, os regulamentos e as políticas nacionais. Como centros de recursos biológicos, podem conter coleções de organismos cultiváveis (microrganismos, células de plantas, animais e humanas), organismos viáveis mais ainda não cultivados. A importância da conservação *ex-situ* de recursos genéticos microbianos, vegetais e animais é reconhecida como uma prática indispensável ao desenvolvimento da ciência e da tecnologia em diversos setores de importância socioeconômica (Smith e Onions, 1994; Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*, 2004).

As coleções microbiológicas fornecem linhagens de microrganismos para a comunidade científica e institutos federais e privados com as mais diversas finalidades, devendo, portanto garantir que o potencial patogênico e biotecnológico desses microrganismos seja conservado (Smith e Onions, 1994).

A Coleção de Culturas – Micoteca URM está citada em vários catálogos, destacando-se no American Type Culture Collection (ATCC) nos Estados Unidos, no Institute for Fermentation em Osaka no Japão (IFO) e no World Data Center for Microorganisms (WDCM) no Japão. No acervo da Micoteca URM constam aproximadamente 8.000 culturas de fungos, sendo cerca de 1.300 leveduras e 6.700 fungos filamentosos, todas identificadas em nível de espécie e mantidas em duplicata em cada método de preservação (óleo mineral, liofilização, água destilada esterilizada e a - 80° C) (Micoteca URM, 2009).

2.2. Preservação de microrganismos

A preservação de culturas fúngicas tem como objetivo manter a completa viabilidade e estabilidade dos organismos estocados, por longos períodos de tempo, o que é conseguido basicamente pelo retardo ou pela paralização do metabolismo celular dos

fungos, nesse sentido, inúmeros processos físicos podem ser utilizados (Neufeld e Sarquis, 2003).

Os métodos comumente empregados para a preservação de microrganismos incluem: óleo mineral, água destilada, salina com óleo mineral, sílica gel, solo, liofilização, congelamento a -70°C e nitrogênio líquido (Souza, 2007).

De acordo com Souza (2007), problemas como perda de viabilidade, mudanças fisiológicas de aspecto e coloração, decréscimo ou perda da capacidade de esporulação e da patogenicidade aparecem constantemente em culturas após repicagens sucessivas, em meios naturais e artificiais, o que tornou necessário desenvolver outros métodos mais eficientes, para manter culturas viáveis e menos sujeitas a variações.

2.3. Preservação sob óleo mineral

O método de preservação sob óleo mineral, inicialmente utilizado por Lomiére e Chevrotier para aumentar a longevidade e reduzir a variabilidade de culturas de *Gonococus*, passando depois a ser aplicado também para fungos. A experiência demonstrou que pelo emprego desse método, as repicagens da maioria das espécies pertencentes à Coelomicetos e alguns Basidiomicetos podem ser realizadas nos intervalos de 12 a 24 meses, sem problemas (Fennel, 1960).

Para preservação sob óleo mineral, é necessário que culturas fúngicas jovens desenvolvidas em tubos contendo meios de cultura solidificado, inclinado a 30° com a horizontal, sejam submersas em uma camada de óleo mineral esterilizado. O armazenamento pode ser à temperatura ambiente ou de acordo com a necessidade do fungo e os tubos devem ser mantidos permanentemente na posição vertical para que o óleo não toque os tampões de algodão (Figueiredo, 2001).

As vantagens desse método esta relacionada ao baixo custo com equipamentos, eficiência no controle da contaminação por ácaros, mantêm a viabilidade das espécies por um longo período e armazenamento de espécies que não sobrevivem em outros métodos. Enquanto que a dificuldade do crescimento de algumas culturas reativadas, espaço para armazenamento dos tubos, rotina de repicagem para manutenção das culturas e contaminação por outros organismos são algumas das desvantagens dessa técnica (Smith e Onions, 1994; Figueiredo, 2001).

O óleo mineral previne a desidratação do meio de cultura, reduzindo a atividade metabólica e o crescimento, por reduzir a tensão de oxigênio. A reativação é feita pela remoção de um fragmento da cultura e transferência para meio líquido (caldo glicosado) ou sólido (específico para o fungo) (Figueiredo, 2001; Nakasone, 2004).

A escolha do método de estocagem a ser utilizado leva em conta vários fatores, de acordo com o objetivo da coleção. Assim, uma pequena coleção docente difere daquelas que são depositárias nacionais. Se o objetivo é classificar taxonomicamente os cultivos, necessita-se de métodos que garantam a estabilidade morfológica dos microrganismos. Do mesmo modo, uma coleção de interesse para a indústria deve dar ênfase aos métodos que mantenham a estabilidade genética (Bueno e Gallardo, 1998).

2.4. Proteases

As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos e biotecnológicos. Podem ser obtidas de vários tecidos de origem animal, vegetal ou a partir de microrganismos. São classificados pelo pH ótimo ou pela natureza química do seu sítio ativo (Said e Pietro, 2004).

Com base no ponto de clivagem da cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas às extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (Rao *et al.*, 1998).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atividade, fundamentando-se nessa característica são classificadas como: ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm atividade na faixa de pH 2,0 a 6,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. Proteases neutras têm atividade em valores de pH entre 6,0 e 8,0, e as proteases alcalinas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 (Rao *et al.*, 1998).

2.5. Queratinases e atividades queratinofílicas e queratinolíticas

A queratina pertence ao grupo das proteínas fibrosas com a estrutura de hélice na forma alfa (Figura 1), esta estrutura é responsável pela elasticidade que se observa no cabelo. Quando é esticada na presença de água a queratina passa para a forma de

zig-zague de β queratina. Este substrato pertence à classe das escleroproteínas, é insolúvel em água e em solventes orgânicos, resistente a ácidos e álcalis diluídos. Sua hidrólise pelos ácidos fortes fornece aminoácidos, como histamina, lisina e arginina e em maior proporção cistina e tirosina. Tanto fungos dermatófitos quanto não dermatófitos podem colonizar e invadir a queratina da pele, unha e cabelo. As estruturas dos fungos que aderem mais freqüentemente aos substratos queratinosos são fragmentos de hifas (Zurita e Hay, 1987).

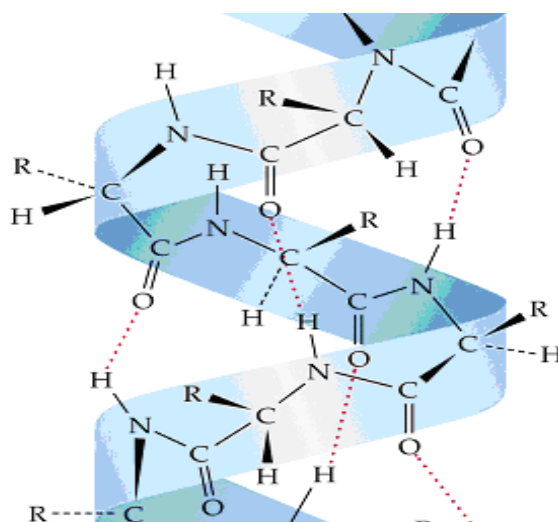


Figura 01. Fragmento da estrutura química da queratina (alfa hélice). Ligações em pontilhado são pontes de hidrogênio. As ligações amida são os sítios de ataque das queratinases. (adaptado: Creighton, 1989)

A utilização comercial das queratinases recentemente ganhou impulso biotecnológico, devido ao isolamento de microrganismos não patogênicos que possuem habilidade em degradar a queratina insolúvel de penas e transformá-las em alimentos economicamente úteis (Onifade *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999; Riffel *et al.*, 2003), fertilizantes nitrogenados, colas e lâminas (Friedrich e Kern, 2003; Schrooyen *et al.*, 2001; De Toni *et al.*, 2002). As queratinases são utilizadas tradicionalmente em diversos setores industriais como na produção de detergentes, de cosméticos, de couros, de ração (Farag e Hassan, 2004), na medicina, assim como em novos campos como no tratamento da doença do mal da vaca louca e na manufatura de plásticos biodegradáveis (Langeveld *et al.*, 2003).

A temperatura ótima das queratinases está na faixa entre 30 e 80°C, no entanto, a enzima de *Chrysosporium keratinophilum* (Dozie *et al.*, 1994) e *Fervidobacterium*

islandicum AW-1 (Nam *et al.*, 2002) mostrou temperatura ótima de atividade excepcionalmente alta entre 90 e 100°C, com meia vida de 30 e 90 minutos, respectivamente.

Tatineni *et al.* (2007) usando a metodologia de superfície de resposta conduziram um estudo para otimizar a produção das queratinases e atividade enzimática em penas de aves domésticas por *Streptomyces* sp. Inicialmente diferentes concentrações de sais foram testadas para a produção máxima das queratinases a um pH constante de 6,5 e uma concentração de pena de 5g/L. Uma combinação com K₂HPO₄, KH₂PO₄ e NaCl foi obtido uma produção máxima de queratinase (70,9U/mL). No primeiro estudo utilizando a metodologia de superfície de resposta, as cinco variáveis selecionadas (ração de pena, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl e pH) foram otimizadas.

2.6. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos

Alguns fungos são importantes ecologicamente e assim despertam grande interesse em todo o mundo, por possuírem um papel significativo na bioconversão de resíduos queratinizados (Abdel-Hafez *et al.*, 1990; Marchisio *et al.*, 1991; Ali-Shtayeh e Jamous, 2000).

A diferença entre fungos queratinofílicos e queratinolíticos esta baseada na utilização e/ou destruição da queratina. Os fungos queratinolíticos são capazes de decompor a queratina presente no substrato, sendo potencialmente patógenos ao homem e outros animais. Por outro lado, espécies queratinofílicas são capazes apenas de usar materiais naturalmente associados com a queratina, ou resultantes de sua degradação (Marchisio *et al.*, 1991; Ulfig *et al.*, 1997).

Os fungos queratinolíticos são capazes de utilizar a queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento destes microrganismos em substratos que contêm queratina indica sua capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas que podem degradar o complexo das queratinas (Onifade *et al.*, 1998).

Os fungos queratinofílicos podem representar um alto risco para o homem, direto ou indiretamente através das dermatomicoses de humanos e animais (Papini *et al.*, 1998); com degradação da queratina da pele, pelos e unhas, ocasionando lesões cutâneas e muco-cutâneas, podendo em alguns casos progredir para formas profundas com quadros clínicos invasivos, como as formas de pseudomicetomas (Lacaz *et al.*, 2002).

Wawrzekiewicz *et al.* (1991), estudaram a habilidade de 16 extratos de dermatófitos em utilizar substratos de queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. Os substratos utilizados incluem solubilizados de queratina natural do cabelo, de pêlos de porquinho-da-índia e de penas de galinha. A preparação de queratina de pena constitui um modelo conveniente para estudo preliminar da atividade queratinolítica. Foi observado que, das 16 amostras de fungos, 13 sintetizaram principalmente queratinase intracelular, enquanto três amostras de *Trichophyton verrucosum* liberaram enzimas principalmente para o meio. A queratina procedente do cabelo e pena foi degradada por poucas amostras dos fungos estudados que, em condições experimentais, produzem esporos característicos. A solução de queratina de pêlo do porquinho-da-índia foi atacada apenas por *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, e apenas *T. gallinae* cresceu em queratina natural de pena de galinha.

Okafur e Ada (2000) estudando as diferenças taxonômicas nas atividades queratinofílicas de cinco espécies distintas de dermatófitos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum audouinii* e *M. gypseum*, isoladas de amostras clínicas em crianças de uma escola primária e utilizando cabelo humano como substrato, observaram que todas as espécies testadas apresentavam atividade queratinofílica da primeira a quinta semana, destacando, *T. rubrum*, entre as espécies que apresentaram maior atividade queratinofílica. Apenas *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* causaram danos estruturais na haste do cabelo.

Katiyar-Sarika e Kushwaha (2002) estudaram a habilidade de degradação do cabelo humano e liberação de proteína de substratos queratinosos *in vitro* pela ação de fungos isolados da poeira de uma casa em Kanpur, Índia. Foram testados 12 fungos queratinofílicos quanto a sua habilidade de colonizar e invadir cabelo e liberar proteína no meio de cultura durante 30 dias. *Chrysosporium indicum* e *M. gypseum* colonizaram o cabelo humano com seis dias, enquanto espécies de *Acremonium* levaram 24 dias para colonizar o cabelo. A deterioração completa do cabelo foi observada nas culturas de *C. indicum*, *C. tropicum* e *C. tropicum* (atípico) no fim de 24 dias. Espécies de *Acremonium* mostraram invasão mínima do cabelo ao final de 30 dias. A maior quantidade de proteína liberada do cabelo humano foi por *C. indicum* e a menor por espécies de *Acremonium*.

2.7. Xilanases e atividade xilanolítica

A xilana representa um importante recurso de biomassa renovável e dispõe de até 20-35% do peso seco da madeira e resíduos agrícolas. Maior componente da hemicelulose em células da parede vegetal, geralmente composto por uma estrutura linear de β -1,4 ligada a unidades de D-xilose (Chen *et al.*, 1997).

Devido a heterogeneidade estrutural as xilanases, precisam ser convertidas a xiloses ou xilooligossacarídeos no processo de bioconversão. Para uma completa e eficiente degradação destes compostos há necessidade de um sistema de enzimas, entre estas as mais estudadas e conhecidas, estão as xilanases que em sua maioria são classificados em famílias glicosídeo hidrolases (Chen *et al.*, 1997; Ruegger e Towk-Tornisie, 2002).

As enzimas xilanolíticas (xilanases), quando livres das celulasas, são utilizadas na indústria de papel e celulose, auxiliando no branqueamento da polpa facilitando a remoção da lignina, podendo se aplicadas para modificar a polpa na formação do papel ou ainda serem utilizadas na reciclagem do papel (Biely, 1993). Estas enzimas, em associação com celulase, podem ser utilizadas para remover as paredes das células vegetais e desta forma, aprimorar o processo de extração de óleos vegetais. São utilizadas em diferentes indústrias para produção de detergente, de tecidos, na fabricação de cereais, na panificação, para melhorar a qualidade final de polpas de frutas, na fabricação de café solúvel, na clarificação de sucos e vinhos, no aumento do teor nutricional da silagem, para conferir textura aos derivados lácteos, na produção de protoplasto para uso em engenharia genética, na produção de biocombustíveis (Wong e Saddler, 1992; Pollet *et al.*, 2009).

As xilanases são enzimas de importante aplicação em diferentes indústrias como as de detergente, têxtil, alimentícia e também no tratamento de resíduos agro-industriais e na bioconversão de materiais lignocelulósicos em açúcares para a produção de bioetanol. Os ambientes tropicais brasileiros mostram uma rica biodiversidade, tornando-se promissores para a pesquisa de novos microrganismos com aplicações biotecnológicas. (Gregg *et al.*, 1998; Bhat, 2000).

Estas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações β 1-4 da cadeia principal da xilana (Figura 2), um dos principais polissacarídeos do complexo hemicelulósico das paredes celulares dos vegetais. A termoestabilidade e a especificidade pela xilana são

responsáveis pelo grande interesse biotecnológico e comercial que as xilanases têm atraído (Vieira e Degreuve, 2001).

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas sequências primárias e tamanho além das limitações destas enzimas pela especificidade ao substrato (Collins *et al.*, 2005). Dentre as enzimas do complexo enzimático destacamos as β -1,4-endoxilanases (β -1,4-*D*-xilana xilanolidase; EC 3.2.1.8), que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidases (β -1,4-*D*-xyloside xylohydrolase; EC 3.2.1.37), que quebram pequenos oligossacarídeos. Os grupamentos laterais presentes na xilana são liberados pela ação das α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidasas e acetilxilana esterases. Todas estas enzimas agem cooperativamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes. A presença de tais sistemas xilanolíticos multifuncionais é comum em bactérias e fungos (Sunna e Antranikian, 1997; Birsan *et al.*, 1998; Belfaqui *et al.*, 2002; Subramaniyan e Prema, 2002).

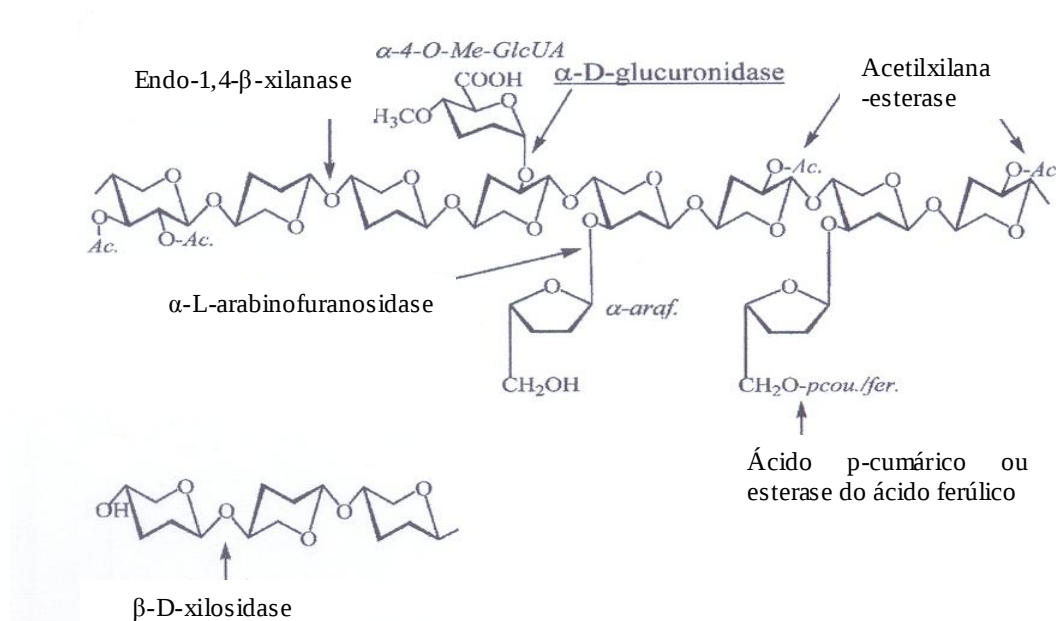


Figura 2. Estrutura da xilana e sítios de ataque por enzimas xilanolíticas (Collins *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas envolvendo uma diversidade de microrganismos potencialmente capazes de produzir xilanases estão disponíveis. Em 2006, Guimarães e colaboradores caracterizaram enzimas produzidas por diferentes fungos filamentosos, isolados do solo e húmus, plantas e bagaço de cana de diferentes regiões de São Paulo. Quarenta isolados foram analisados quanto à sua capacidade de produzir xilanase, glicose

oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase. Dentre estes, vinte e três isolados exibiram potencial enzimático. As xilanases produzidas por dois destes isolados (*Aspergillus caespitosus* e *A. phoenicis*) mostrou um bom potencial para o branqueamento da celulose.

Liu *et al.* (1998), estudando o isolado de *Trichosporon cutaneum* SI409 com o objetivo de testar diferentes fontes de carbono obtiveram bons resultados, sendo a atividade máxima de 14,3U/mL, utilizando xilana como fonte de carbono.

Quinghe *et al.* (2004), estudaram a influencia de diferentes fatores ; fontes de carbono e nitrogênio, aeração, pH, tamanho do inoculo, tempo de fermentação para produção de xilanases pelo fungo *Pleurotus ostreatus* SYJ042, cuja atividade máxima foi de 24,98U/mL.

Heck *et al.* (2005) avaliaram as condições ideais de tempo de cultivo, aeração e temperatura para produção de xilanase por *Bacillus circulans* BL53 que atingiu atividade máxima de 0.928U/mg.

Kheng e Ibrahim (2005), verificaram que adição de xilose aumentou em 32% a produção de xilanase por *A. níger* USMA1 I, obtendo atividade máxima de 35U/g.

Nenawe *et al.* (2006), caracterizaram qualitativamente e quantitativamente 88 isolados de actinomicetos, destes 20 amostras foram coletadas em diferentes locais e em regiões próximas a cidade de Dehli, Índia. Entre estes, em 69 isolados foram detectados a produção de xilanases, mostrando zona ao redor das colônias após coloração com vermelho Congo. Neste trabalho, as espécies de *Trichoporon* testados também foram capazes de degradar a xilana em meio sólido.

Amani e colaboradores (2007) verificaram a influencia da glicose e de duas fontes de nitrogênio (extrato de levedura e triptona), na produção de xilanases por *Bacillus pumilus*, e concluíram que a produção desta enzima é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de glicose e inversamente a adição de extrato de levedura. A atividade máxima de 12,9 mg/mL foi obtida utilizando glicose e extrato de levedura.

Azin *et al.* (2007) com *Trichoderma longibrachiatum* cuja maior atividade foi 50U/mL após 96 horas, e superior aos obtidos por e concentração da fonte de carbono, dos sais minerais, efeitos da umidade, temperatura, pH, tamanho do inóculo e do tipo de fonte de nitrogênio.

Li *et al.* (2007), que trabalharam com o isolado *Penicillium oxalicum* ZH-30 efeitos da concentração de substrato, pH e tempo de cultivo para produção de xilanases obtiveram 14,91U/ mL de atividade.

Nair *et al.* (2008) estudaram o potencial de produção de xilanase por fungos filamentosos (espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Gliocladium*) isolados de solo e identificaram as condições necessárias para secretarem a quantidade máxima de xilanase durante a fermentação. Setenta cepas fungicas foram isoladas de solos, coletados em diferentes partes do sul de Kerala, na Índia. As cepas foram selecionadas para a produção de xilanase utilizando meio Czapek modificado. Trinta e quatro linhagens de fungos que formaram halo de degradação foram selecionadas e identificadas. Todas as cepas produziram celulase juntamente com xilanase em fermentação em estado sólido, enquanto que 70% das cepas produziram celulase, livre de xilanase durante a fermentação por cultura submersa.

Parachin *et al.*, 2009 caracterizaram a xilanase produzida pela cepa *Cryptococcus flavus* I-11, obtendo a máxima atividade enzimática de 130U/mL.

Cui e colaboradores (2009) em estudo de otimização do processo de produção de xilanases por *P. thiersii* ZH-19 utilizando os seguintes parâmetros: pH, temperatura, concentração da fonte de carbono e tempo de cultivo. Obtiveram atividade máxima de 80.23 U/ mL após o período de 132 horas de fermentação.

A maioria dos trabalhos que envolvem a produção de xilanases são realizados utilizando fungos filamentosos Nair *et al.* (2008), bactérias Li *et al.* (2007), sendo evidenciando a carência de trabalhos com leveduras Liu *et al.* (1998); Parachin *et al.*, 2009 para produção desta enzima.

2.8. Importância do gênero *Trichosporon*

As leveduras constituem um grupo de fungos unicelulares que, no meio ambiente, podem viver como sapróbias. São seres heterotróficos, necessitam de matéria orgânica elaborada para sua nutrição; a absorção dos nutrientes ocorre pela ação de enzimas que hidrolisam as macromoléculas e permitem sua assimilação através dos mecanismos de transporte ativo e passivo (Lacaz *et al.*, 2002). As leveduras têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma

variedade de nutrientes em distintas condições ambientais, muitas destas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais (Silva-Neves *et al.*, 2006).

Espécies de *Trichosporon* podem ser encontradas no solo, na água e, ocasionalmente, fazendo parte da microbiota normal da pele, unhas e mucosas do trato respiratório e gastrointestinal humano. O gênero *Trichosporon* passou por uma extensa reavaliação taxonômica e atualmente, inclui 37 espécies. Sete desses estão implicados em infecções em seres humanos: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides* e *T. loubieri* (Liu *et al.*, 1998; Chowdhary *et al.*, 2004; Fagundes *et al.*, 2008).

Este gênero não apresenta fase de reprodução sexuada, no entanto características bioquímicas indicam uma relação com a divisão Basidiomycota (Barnett *et al.*, 2000). As colônias possuem crescimento rápido, coloração que pode variar do branco ao branco-amarelado, com textura lisa, enrugada, cerosa, globosa a aveludada. O aspecto enrugado da cultura se torna mais proeminente com o tempo, o centro elevado da colônia é típico. Sua micro-morfologia caracteriza-se pela presença abundante de blastosconídeos unicelulares de forma variada e de pseudo-hifas bem desenvolvidas. A característica mais típica é a produção de artroconídios, unicelulares com forma prolongada, cúbica ou de barril. A produção de enzimas é uma das características importantes deste gênero, bem como algumas espécies apresentam interesse médico como agentes etiológicos de piedra branca, infecções superficiais e trichosporonoses invasiva (Barnet *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002).

Trichosporon tem emergido como patógeno oportunista, que podem causar micoses sistêmicas com risco de vida a pacientes imunodeprimidos (Barnet *et al.*, 2000; Bentudo, 2008; Magalhães *et al.*, 2008). Apesar disso, a infecção por *Trichosporon* é rara, tanto em indivíduos imunocompetentes como em pacientes imunodeprimidos (Sugita *et al.*, 1998; Maves e Hale, 2006).

Pacientes imunodeprimidos possuem o risco de desenvolver infecção invasiva, que geralmente progride rapidamente, envolvendo vários órgãos e sistemas, incluindo pulmões, rins e baço. Além de lesões cutâneas que são uma manifestação provável da infecção disseminada. *Trichosporon* é um dos fungos isolados de amostras clínicas de pacientes com fungemia usando válvulas protéticas, lesões no sistema nervoso central, córnea e região peritoneal (Fagundes *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

Dentre os gêneros de leveduras de interesse biotecnológico destaca-se *Trichosporon*, que tem sido relatado como produtor de xilanases, lipases e outras enzimas (Cordeiro, 1997; Yan *et al.*, 2008).

Silva-Neves e colaboradores (2006) trabalharam com 26 espécies de leveduras, dentre estas três espécies de *Trichosporon* para produção de proteases em meio líquido, no período de 72 horas obtendo as seguintes atividades: *T. adeninovorans* 16mm e 40 U/mL, *T. aquatile* 10mm e 40 U/mL, e *T. mucoides* 12mm e 33 U/mL.

2.9. Fermentação por cultura submersa

A produção de enzimas envolve dois tipos de processos que são a fermentação em estado sólido e fermentação por cultura submersa (Reguly, 2000). A fermentação por cultura submersa tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis no qual ocorre o crescimento do microrganismo (Martins, 2001; Bon, 2008).

Esse processo apresenta variáveis na forma de condução podendo ser contínuo, descontínuo e semicontínuo. No processo contínuo (Montesinos *et al.*, 1996) há um fluxo ininterrupto de entrada de substrato e saída de caldo fermentado conforme as necessidades do microrganismo; os processos descontínuos são conduzidos na forma de batelada, isto é, o meio de cultura é inoculado com microrganismo e o processo segue até o esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo do produto de interesse. O referido processo consiste na alimentação do reator durante a fermentação, visando o aumento da produção e permitindo o estudo dos aspectos cinéticos do processo (Pinheiro, 2006).

A produção de queratinases e xilanases por fermentação por cultura submersa pode ser realizada em Erlenmayer, incubados sob agitação em fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial, podendo-se controlar uma série de variáveis, tais como temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio; com o intuito de garantir o máximo de rendimento no decorrer do processo. Nesse sistema de produção, os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio submerso tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelo microrganismo. A grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas por este processo de fermentação (Pandey *et al.*, 2003; Reguly, 2000; Borzani *et al.*, 2001).

O sucesso da realização da fermentação por cultura submersa depende principalmente da seleção de um microrganismo adequado, a idade da cultura pode interferir na produção, pois as culturas jovens são mais produtivas. Outros fatores como a temperatura de armazenamento dos esporos e a composição do meio de esporulação também influenciam na produção (Trevan *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 1

Viabilidade, autenticação taxonômica e caracterização queratinofílica e queratinolítica de culturas de *Trichosporon* da Micoteca URM¹

O. C. Souza*¹, M. A. Sousa¹, T. S. Porto², E. B. Souza¹; C. M. Souza-Motta¹, O. M. C. Magalhães¹

¹Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária- CEP: 60570-420- Recife- PE- Brasil- Email: olimicomed@yahoo.com.br

²Departamento de Morfologia e Fisiologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Trabalho submetido para publicação na revista Mycoses

RESUMO

O gênero *Trichosporon* compreende leveduras blastoartrosporada com amplas variações fenóticas, possuindo características morfológicas distintas como células de leveduras, micélio verdadeiro e artrosporos. Este gênero apresenta capacidade de produzir diversas enzimas, como queratinases, enzimas com ampla utilização em processos industriais e biotecnológicos. Os objetivos deste estudo foram verificar a viabilidade, autenticar a taxonomia, caracterizar quanto à capacidade queratinolítica e/ou queratinofílica em penas de aves, em meio sólido e cultivo submerso em 22 culturas pertencentes a sete espécies de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral mantidas na Micoteca URM. As culturas foram reativadas através de repique da colônia original do fungo para um tubo contendo caldo glicosado, mantido a 28 °C durante 72 horas. Após o crescimento, um inóculo foi repicado para o meio ágar Sabouraud contendo 0,5 % de extrato de levedura (SYE) a 28 °C para posterior autenticação. Para caracterização queratinolítica e/ou queratinofílica foi utilizado penas de aves como substrato inoculadas com suspensão de fungos, observadas a cada dez dias por um período de 30 dias com posterior realização do retrocultivo. Disco de 5 mm de micélio foram utilizados em meio sólido e líquido. A detecção da produção de queratinases em meio sólido foi avaliada pela formação de halo e a determinação da atividade queratinolítica foi realizada através de leitura em espectrofotômetro a 260-280 nm, foram determinado pH e temperatura ótimos para a atividade queratinolítica. Das 22 culturas avaliadas, 20 estavam viáveis, manteve as características morfo-fisiológicas, sendo confirmada a espécie depositada. Os vinte isolados viáveis foram capazes de colonizar as penas, apresentando atividade queratinofílica. Em meio sólido, todas as culturas apresentaram crescimento, sem presença de halo de degradação, contudo em cultivo submerso, todas as culturas apresentaram atividade queratinolítica, sendo *T. aquatile* URM4440 com 2,65 U/mL, o melhor produtor. Todos líquidos metabólicos, mantiveram o pH próximo a 7,4, e a média da biomassa foi de 0,38 g, não sendo verificada relação entre o pH e a biomassa com atividade queratinolítica. *T. aquatile* URM4440 apresentaram atividade queratinolítica ótima em pH 8,6 Tris-HCl a 40 °C. Esta cultura demonstrou ser promissora para posterior estudo de otimização das condições de produção.

Palavras-chave: *Trichosporon*, preservação, queratinofílico, queratinolítico, queratinases

ABSTRACT

The genus *Trichosporon* includes yeast blastoarthrospora with wide phenotypic variation, and has distinct morphological characteristics as yeast cells, mycelium and true arthrospores. This genre has the capacity to produce many enzymes keratinases, enzymes with broad use in industrial processes and biotechnology. The objectives of this study was to determine the feasibility, to endorse the taxonomy, to characterize the ability keratinophilic and/or keratinolytic in feathers, in solid and submerged cultivation in 22 cultures belonging to seven species of *Trichosporon* preserved under mineral oil maintained at URM Culture Collection . Cultures were revived by subculture of the original colony of the fungus to a tube containing glucose broth, kept at 28 °C for 72 hours. After growth, an inoculum was transferred to an agar medium containing 0.5 % yeast extract (SYE) at 28 °C for further authentication. The characterization keratinophilic and/or keratinolytic was used bird feathers as a substrate inoculated with a suspension of fungi, observed every ten days for a period of 30 days with subsequent completion of retrocultivo. Disc 5 mm mycelium were used in solid and liquid. Detection of production of keratinases solid medium was evaluated by the formation of halo and determination of keratinolytic activity and determined pH and temperature optima for keratinolytic activity. Of the 22 cultures evaluated, 20 were viable, retained the morphological, physiological, and confirmed the species deposited. Twenty isolates viable were able to colonize the feathers, giving keratinophilic activity. In solid medium, all cultures showed growth, without the presence of halo of degradation, but in submerged cultivation, all cultures showed keratinolytic activity, and URM4440 *T. aquatile* with 2.65 U/mL, the best producer. All net metabolic kept the pH around 7.4, and the average biomass was 0.38 g and is not verified relationship between pH and biomass with keratinolytic activity. URM4440 *T. aquatile* keratinolytic activity at pH 8.6 Tris-HCl at 40 °C. This culture proved to be promising for further study of optimization of production conditions.

Keywords: *Trichosporon*, preservation, keratinophilic, keratinolytic, keratinases

INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais, com ampla aplicação em processos industriais como, na indústria de detergentes que representa um grande mercado consumidor de proteases, assim como as indústrias de alimentos e artigos de couro (Gupta *et al.*, 2002).

As queratinases são uma classe particular de enzimas, proteolíticas que possuem a capacidade de degradar substratos a base de queratina. Estas enzimas vêm ganhando importância nos últimos anos, com várias aplicações, seus potenciais têm sido associados com a hidrólise de substratos queratinosos entre outras aplicações. Queratinas são as proteínas mais abundantes nas células epiteliais dos vertebrados e são os principais constituintes da pele e seus apêndices, unhas, pelos, penas e lã (Onifade *et al.*, 1998).

Resíduos ricos em queratina são difíceis de serem degradados, tendo em vista que o polipeptídeo possui cadeias condensadas e fortemente estabilizadas por várias ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, além de várias pontes dissulfeto (Kushwaha, 1983; Gradisar *et al.*, 2000).

A queratina é o principal constituinte estrutural de penas de aves, que são subprodutos de uma das indústrias que mais cresce no Brasil, a avicultura. Essas penas causam um grande problema ambiental, tendo em vista o tempo que levam para serem degradadas. A queratina de penas insolúvel pode ser convertida após a hidrólise enzimática em rações para animais, fertilizantes, colas, filmes e/ou utilizadas para a produção de aminoácidos raros serina, cisteína e prolina (Papadopoulos *et al.*, 1989; Onifade *et al.*, 1998; Gupta e Ramnani, 2006).

As queratinases microbianas têm se tornado biotecnologicamente importantes, devido à capacidade de hidrolisarem a queratina e são amplamente produzidas por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Kaul e Sumbali, 1999; Riffel *et al.*, 2003; Brandelli e Riffel, 2005). Alguns fungos são importantes ecologicamente, sendo de grande interesse por possuírem um papel significativo na bioconversão de resíduos queratinizados (Abdel-Hafez *et al.*, 1990; Marchisio *et al.*, 1991; Ali-Shtayeh e Jamous, 2000).

A diferença entre fungos queratinofílicos e queratinolíticos esta baseada na utilização e/ou destruição da queratina. Os fungos queratinolíticos são capazes de decompor a queratina presente no substrato. Por outro lado, espécies queratinofílicas são

capazes apenas de usar materiais naturalmente associados com a queratina, ou resultantes de sua degradação (Marchisio *et al.*, 1991; Ulfig *et al.*, 1997).

O gênero *Trichosporon* compreende um grupo de leveduras que não apresenta fase de reprodução sexuada, suas características bioquímicas indicam uma relação com a divisão Basidiomycota (Barnett *et al.*, 2000).

Dentre os gêneros de leveduras de interesse biotecnológico destaca-se *Trichosporon*, que tem sido relatado como produtor de xilanases, lipases e proteases (Cordeiro, 1997; Silva-Neves *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2008).

Os objetivos deste trabalho foram verificar a viabilidade, autenticar a taxonomia e caracterizar quanto à capacidade queratinolítica e/ou queratinofílica culturas de *Trichosporon* preservados sob óleo mineral na Micoteca URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Materiais e métodos

Microrganismos

Foram avaliadas 22 culturas de *Trichosporon* pertencentes a sete diferentes espécies, preservadas sob óleo mineral (Sherf, 1943) de 1955 a 2009 (quadro I), na Coleção de Culturas – Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

Reativação e autenticação taxonômica das culturas

As culturas foram reativadas através de repique da colônia original do fungo para um tubo contendo caldo glicosado, mantido a 28 °C durante 72 horas. Após o crescimento, um inóculo foi repicado para o meio de crescimento específico, ágar Sabouraud contendo 0,5% de extrato de levedura (SYE) a 28 °C. A cultura pura foi autenticada segundo as características morfológicas e fisiológicas, seguindo procedimentos padronizados (Barnett *et al.*, 2000, Hoog *et al.*, 2000).

Detecção da atividade queratínofílica e/ou queratinolítica

Para a determinação da atividade queratínofílica e ou queratinolítica foi adotado o método de Vanbreuseghem (1952) modificado em triplicata. Amostras das culturas foram suspensas em 9 mL de solução salina e Tween 80, equivalente à escala 0,5 de McFarland. Desta solução, 2 mL foram dispostos sob placas de Petri contendo 2 g de fragmentos de penas de galinhas previamente desengorduradas e esterilizadas. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por até 30 dias e a cada 10 dias foram removidos 3 fragmentos de pena e preparadas lâminas com *azul de Aman* para observação microscópica da colonização (atividade queratínofílica) e da perfuração (atividade queratinolítica) da pena. Como controle de esterilização das penas, foram distribuídos 9 mL de salina com Tween 80 em placas mantidas nas mesmas condições do teste.

Das placas onde se observou crescimento do fungo na pena, foi realizado retrocultivo através de repique para o meio SYE contido em placa de Petri, para autenticação taxonômica.

Detecção em meio sólido

Discos de micélio com 5 mm de cultura de *Trichosporon* crescidas em ágar SYE (Lacaz *et al.*, 2002), foram inoculados em meio sólido, composto de sais e penas de frangos processadas, a temperatura de 28 °C e 37 °C em estufa do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (TECNAL TE424, Piracicaba, Brasil), durante sete dias em triplicata. A detecção em meio sólido foi avaliada pela formação de halo (Friedrich *et al.*, 1999).

Cultivo submerso

Discos de 5 mm foram inoculados em 50 mL de meio líquido contido em Erlenmeyers de 250 mL, utilizando solução de sais K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e penas de frangos 0,37 (g/mL) como única fonte de carbono e nitrogênio, pH 8,0, incubados a 30 °C sob agitação de 120 rpm, incubados em agitador orbital (TECNAL TE424), durante 10 dias (Anbu *et al.*, 2007).

Determinação do pH final do líquido metabólico e da Biomassa

O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro (CELAB 21-22 μ m) para determinação do pH final do líquido metabólico e a massa micelial foi lavada com água destilada esterilizada e seca a 105 °C “overnight” até peso constante. O líquido metabólico foi denominado extrato bruto (EB).

Atividade queratinolítica

A atividade queratinolítica foi determinada de acordo com Anbu *et al.* (2007), utilizando-se solução de substrato, composta de 20 mg de penas diluída em 3,8 mL de tampão Tris-HCl (1 mM, pH 7,8), acrescida de 0,2 mL do EB. A mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora, em seguida resfriada a 4 °C por um período de 10 minutos. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se BSA (soro albumina bovina) como padrão. A determinação da atividade queratinolítica foi realizada através de leitura em espectrofotômetro a 280 nm, o aumento de 0,1 em absorbância indicou uma unidade de atividade enzimática.

Efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima

O efeito do pH foi determinado a 37 °C em diferentes pH, utilizando os tampões: acetato de sódio 0,05 M pH 4,0-6,0, fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5-7,5, Tris-HCl 0,05 M pH 7,8-9,0, e carbonato de sódio, 0,05M pH 9,4-10,2. O efeito da temperatura foi verificado após determinação do pH ótimo, pela incubação do extrato enzimático com os respectivos substratos, com variações de temperatura entre 20 a 80 °C, com uma faixa de variação de 10 °C, por um período de 1 hora. A atividade enzimática foi realizada como descrita anteriormente e as análises realizadas em triplicata de acordo com Anbu *et al.* (2007).

Resultados e discussão

Viabilidade e autenticação taxonômica

Das 22 culturas utilizadas preservadas de 1955 a 2009, apenas 9% das culturas de *Trichosporon* URM3963 e URM4914 não apresentaram crescimento e 91% estavam viáveis (Quadro I), mantendo as características taxonômicas, tais como coloração, textura da colônia, além de características microscópicas e fisiológicas típicas das espécies depositadas, mostrando que o método de preservação sob óleo mineral foi eficiente para a preservação de culturas deste gênero. Os 20 isolados viáveis e autenticados foram selecionados para teste de caracterização queratinofílico e ou queratinolíticos.

As culturas apresentaram coloração variando de branca a bege, com textura coreacea a granular, em meio SYE a 28°C. A microscopia mostrou artroconídios, arredondados e presença de pseudomicélio. Das 22 amostras avaliadas, 9 foram isoladas de amostras clínicas (58,4%), 2 do solo (16,7%), 1 do ar (8,3%), 1 de penas de aves (8,3%) e 1 goma de mandioca (8,3%).

Neste trabalho, o tempo de preservação sob óleo mineral foi de 54 anos, obtidos com as culturas URM572 e URM573, sendo esse dado superior aos obtidos por Smith e Onions (1994) que consideram que a preservação de fungos sob óleo mineral é de até 40 anos. Nakasone *et al.* (2004), verificaram culturas fúngicas viáveis, após preservação sob óleo mineral, por um período de até 32 anos, também inferior ao período dos isolados URM572 e URM573 que além de viáveis mantiveram as características taxonômicas e fisiológicas. Braz *et al.* (2009), trabalhando com 31 culturas de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral, obteve viabilidade em 26, sendo 24 autenticadas taxonomicamente, estando estes resultados compatíveis com os encontrados em nosso experimento, onde 20 foram viáveis e taxonomicamente autenticadas, algumas com até 54 anos de estocagem.

Seleção queratinofílica e/ou queratinolítica de culturas de *Trichosporon*

Dos 20 isolados testados, em todas as placas contendo penas foram observados crescimento fúngico. Os fragmentos de penas quando observados ao microscópio com 10, 20 e 30 dias, evidenciaram colonização pelas culturas de *Trichosporon* (Figura 1a, b e c), não sendo observados órgãos de perfuração. Ao final de 30 dias, fragmentos das penas

colonizadas foram transferidos para placas contendo meio SYE para reobtenção e confirmação da espécie inoculada.

Quadro I. Caracterização de espécies de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral, para avaliar a capacidade queratinofílica e queratinolítica, pelo crescimento e degradação de penas de aves contidas em placas a 28 °C e 37 °C, durante 30 dias.

Registro URM	Espécies	Ano de estoque	Viabilidade	Queratinofilia
4440	<i>Trichosporon aquatile</i> L. R. Heedrick & Dupont	2002	+	+
572	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	1955	+	+
573	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	1955	+	+
4250	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2000	+	+
4251	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2000	+	+
4437	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2002	+	+
4789	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2004	+	+
4846	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2004	+	+
4973	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	+	+
5003	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	+	+
5196	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	+	+
5287	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2006	+	+
5397	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2007	+	+
5743	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2007	+	+
5781	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2008	+	+
4488	<i>T. dulcitum</i> (Berkhout) Weijman	2002	+	+
4486	<i>T. gracile</i> M. T. Smith (Guého et al.)	2002	+	+
5973	<i>T. inkin</i> (Oho & Ota) do Carmo-Souza & Van Uden	2009	+	+
5975	<i>T. ovoides</i> (Behrend)	2009	+	+
4259	<i>T. pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	2000	+	+
3963	<i>T. pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	1998	-	NR
4914	<i>T. pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	2004	-	NR

- : não viável; + : crescimento; NR: não realizado

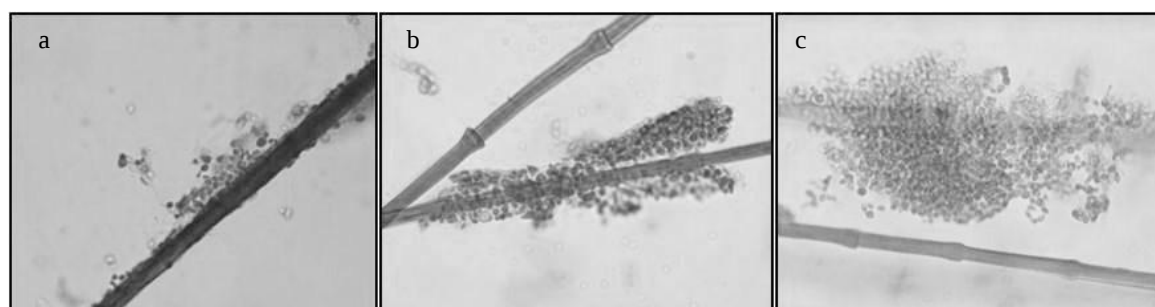


Figura 1. Aspectos microscópicos de penas inoculadas com suspensão de *Trichosporon cutaneum* URM4251 após 10 (a), 20 (b) e 30 (c) dias. (40X)

Sousa (2008) trabalhando com fungos isolados de parques aquáticos obteve 42 isolados capazes de colonizar e degradar queratina, pela técnica de isca de cabelo (“Hair bait”), sendo as linhagens mais promissoras, *Paecilomyces farinosus* e *Fusarium equiseti*. Em 11 das 23 amostras analisadas não foi observada atividade queratinolítica: *Dreschlera briseptata*, *Penicillium aurantiogriseum*, duas culturas de *P. corylophilum*,

P. minioluteum, *P. montanense*, duas culturas de *P. pinophilum*, *P. restrictum*, *P. simplicissimum* e *P. solitum*.

Detecção em meio sólido

Em meio sólido, foi observado crescimento das colônias em todas as placas, no entanto, não houve a formação da zona de degradação ao redor das colônias.

Dentre as culturas avaliadas em meio sólido, todas apresentaram crescimento em meio de queratina, diferenciando dos resultados obtidos por Wawrzekiewicz *et al.* (1991), que testaram a capacidade de dermatófitos em degradar queratina de penas de galinha em meio sólido, e verificou que os isolados de *Trichophyton gallinae* V34 e V80, *T. mentagrophytes*, não apresentaram halo de degradação da queratina neste meio.

Determinação do pH final do líquido metabólico e da Biomassa

Todos os líquidos metabólicos das culturas, mantiveram o pH próximo a 7,4, e a média do peso seco da biomassa foi de 0,38 g (Figura 2). Não foi verificada uma relação entre o pH e a biomassa com atividade queratinolítica.

Cultivo submerso

Em relação à atividade queratinolítica em cultivo submerso (Figura 2) todas as culturas apresentaram atividade, em geral, menor que 2.0 U/mL. A maior atividade queratinolítica foi obtida por *T. aquatile* URM4440 com atividade total de 2,65 U/mL e específica 4.262,50 U/mg, seguida do *T. cutaneum* URM5003 com atividade total de 2,45 U/mL e específica 4.038,24 U/mg, *T. cutaneum* URM573 com atividade total de 2,05 U/mL e específica 3.360,65 U/mg, todos utilizando penas de aves como substrato. A cultura de *T. aquatile* URM4440, maior produtor, foi selecionada para estudo do efeito do pH e da temperatura ótimos para atividade queratinolítica.

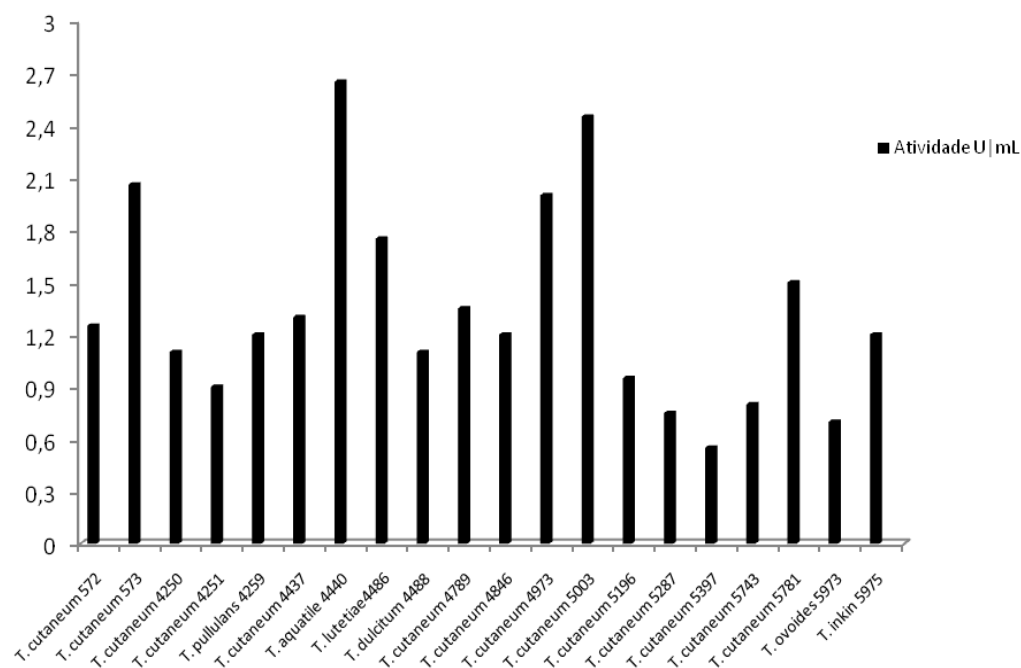


Figura 2. Determinação da atividade queratinolítica de espécies de *Trichosporon*.

Friedrich *et al.* (1999), selecionaram em meio sólido e líquido, fungos capazes de produzir queratinases, utilizando penas de galinha como fontes de carbono e nitrogênio, dentre os fungos testados, a levedura do gênero *Geotrichum* sp, foi capaz de degradar a queratina em meio sólido, formando halo, contudo não apresentou atividade queratinolítica em meio líquido; enquanto que todos os isolados de *Trichosporon*, testados em nosso estudo, foram capazes de produzir queratinases em meio líquido.

Friedrich *et al.* (1999) selecionando fungos para a síntese de enzimas queratinolíticas utilizando pena de aves, obteve como melhor produtor *Aspergillus flavus* o qual produziu 0,781 U/mL após sete dias de cultivo submerso e Anbu *et al.* (2007) com o mesmo substrato, com o isolado *Scopulariopsis brevicaulis* obtiveram a maior produção de 6,2 U/mL após 35 dias de fermentação.

Sales *et al.* (2008) trabalhando com *A. carbonarius*, preservados sob óleo mineral, utilizando pena como fonte de carbono e nitrogênio, obtiveram uma atividade queratinolítica acima de 10 U/mL para algumas amostras e após otimização o isolado *A. carbonarius* URM1546 apresentou atividade queratinolítica de 48,9 U/mL.

Efeito do pH e da temperatura na atividade queratinolítica

O efeito do pH na atividade queratinolítica apresentou ótima atividade em pH 8,6 em tampão Tris-HCl 0,05 M (Figura 3- a), corroborando com os resultados obtidos por Vignardet *et al.* (2001) ao estudarem *Doratomyces microsporus* que obtiveram melhor atividade em pH 8,2.

Os valores de pH estudados para a definição do pH ótimo, estão de acordo com os dados obtidos na literatura numa faixa de 5,0 a 9,0 (Gradisar *et al.*, 2000; Ambul *et al.*, 2005; Tatineni *et al.*, 2007).

Em relação ao efeito da temperatura, verificou-se que a atividade queratinolítica foi maior a 40 °C (Figura 3- b), corroborando com os resultados obtidos por Gradisar *et al.* (2000) que ao estudar a caracterização de *D. microsporus* em cultivo líquido submerso observaram temperatura ótima a 45 °C, e Ambul *et al.* (2005) que ao estudar a produção de queratinases por *Scopulariopsis brevicaulis* obteve temperatura ótima de 40 °C.

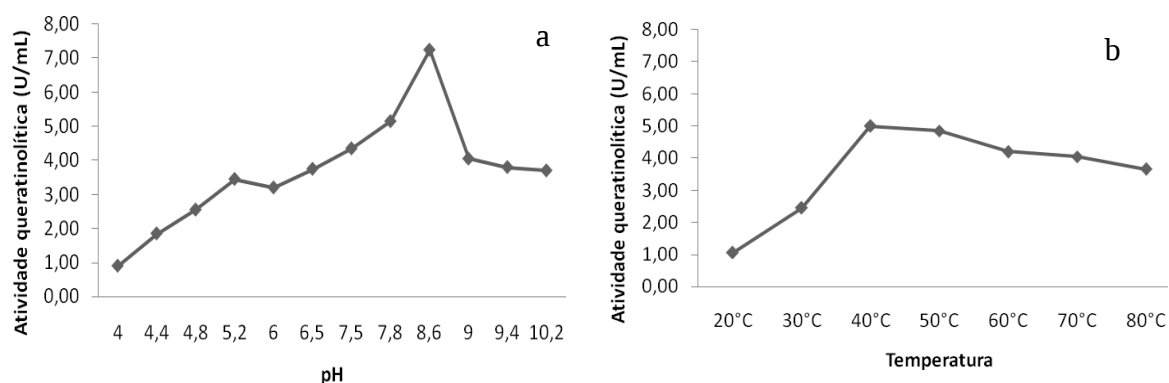


Figura 3. Efeito do pH (a) e da temperatura (b) sobre a atividade queratinolítica (U/mL) do isolado de *T. aquatile* URM4440.

Vignardet *et al.* (2001) estudaram a influência da temperatura, pH, concentração da queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação sobre proteínas solúveis liberadas por uma nova queratinase de *D. microsporus* em um “design” experimental de segunda ordem. Os melhores resultados do estudo de otimização para produção de queratinases foram obtidos nas seguintes condições: pH 8,2; 0,14% de concentração de queratinase (peso da queratinase/volume final); 5% da concentração do substrato (peso da unha pulverizada/volume final) e 38,8 °C de temperatura.

Anbu *et al.* (2005) estudaram a queratinases extracelular produzida por *S. brevicaulis* isolada do solo de fazendas de aves domésticas de Nammakkal, Índia. O pH ótimo a 40 °C foi 8,0 e a temperatura ótima a pH 8,0 foi 40 °C, para a produção desta enzima por este microrganismo.

Embora vários relatos estejam disponíveis a respeito do rendimento da produção e atividade queratinolítica, é difícil comparar os resultados obtidos, uma vez que os microrganismos produtores das enzimas-alvo, as condições de cultivo e produção, o substrato testado, as condições dos ensaios enzimáticos e a forma de definir as unidades são bastante variáveis.

Conclusões

O método de preservação sob óleo mineral mostrou-se eficiente, para a preservação de culturas de *Trichosporon*, 91% estavam viáveis. Dos vinte isolados testados, todos apresentaram crescimento em meio sólido. O pH dos filtrados, assim como o peso seco da biomassa fúngica, não interferiram na atividade enzimática. Na caracterização em meio líquido, todas as culturas produziram queratinases, onde a maior atividade queratinolítica foi obtida por *T. aquatile* 4440URM (2,65 U/ml), seguida do *T. cutaneum* 5003URM (2,45 U/ml) e *T. cutaneum* 573URM (2,05 U/ml). *T. aquatile* 4440URM apresentou maior atividade queratinolítica, tendo uma atividade ótima em pH 8,6, a 40 °C. Com bases nos resultados, *T. aquatile* 4440URM é uma cultura promissora para estudos de otimização das condições de produção de queratinases.

CAPÍTULO 2

Seleção de culturas de *Trichosporon* da Micoteca URM quanto à produção de xilanases e caracterização parcial da enzima

O. C. Souza*¹, M. A. Sousa¹, L. R. C. Silva¹; T. S. Porto²; C. M. Souza-Motta¹,
O. M. C. Magalhães¹

¹Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária- CEP 60570-420- Recife- PE- Brasil- Email: olimicomed@yahoo.com.br

²Departamento de Morfologia e Fisiologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Trabalho a ser submetido para publicação na Brazilian Journal of Microbiology

RESUMO

As xilanases são enzimas de importante aplicação em diferentes setores industriais. A produção comercial de xilanase está concentrada principalmente em dois gêneros de fungos *Trichoderma* e *Aspergillus*. Novas amostras fúngicas devem ser identificadas, na busca de isolados com maior eficiência na produção desta enzima. O gênero *Trichosporon* apresenta células de leveduras e micélio verdadeiro, que se desarticulam formando artroconídios. Espécies de *Trichosporon* têm sido relatadas como boas produtoras de xilanases. Os objetivos deste estudo foram selecionar culturas de *Trichosporon* com a capacidade de produzir xilanases extracelulares e caracterizar parcialmente a sua atividade enzimática. Foram utilizados 20 isolados de *Trichosporon* pertencentes a sete espécies. Para avaliação quanto a capacidade de degradar xilana, discos de micélio de 5 mm das 20 culturas crescidas em ágar Sabouraud acrescido de 0,5% de extrato de levedura contido em placas de Petri, foram inoculados em meio de ágar-xilana, a temperatura de 28 °C e 37 °C em B.O.D. para posterior seleção de culturas para a produção de xilanases utilizando xilose como fonte de carbono, avaliados o pH final dos líquidos metabólicos, biomassa e o efeito do pH e da temperatura na atividade xilanolítica através da quantificação dos açúcares redutores (DNSA). Todas as culturas cresceram em meio sólido, entretanto 12 formaram halo de degradação, sendo selecionadas para o cultivo submerso. A maior atividade xilanolítica em meio líquido, foi obtida por *T. cutaneum* URM4789 com 24,25 U/mL. O pH final dos líquidos metabólicos variou de 6,0 a 7,5, exceto para a amostra *T. cutaneum* URM572 cujo pH diminuiu de 6,0 para 4,65, a média da biomassa fúngica foi de 0,53 g, não sendo evidenciada uma relação entre a atividade xilanolítica e os valores de pH e o peso seco. *T. cutaneum* URM4789 apresentou atividade xilanolítica ótima em pH 6,0 acetato de sódio a 60 °C. Este isolado demonstrou potencialidades biotecnológicas, sendo indicado para estudos de otimização das condições de produção de xilanases.

Palavras chaves: *Trichosporon*, caracterização e atividade xilanolítica, xilanases

ABSTRACT

The xylanases are important enzymes for application in different industrial sectors. The commercial production of xylanase is concentrated mainly in two genera of fungi *Trichoderma* and *Aspergillus*. New fungal samples must be identified in the search for isolated with greater efficiency in the production of this enzyme. The genus *Trichosporon* has yeast cells and true mycelium, which disarticulate forming arthroconidia. *Trichosporon* species have been reported as good producers of xylanases. The objectives of this study were to select cultures of *Trichosporon* with the ability to produce extracellular xylanases and partially characterize its enzymatic activity. We used 20 isolates of *Trichosporon* species belonging to seven. To evaluate how the ability to degrade xylan, mycelium disks of 5 mm from 20 cultures grown on agar medium supplemented with 0.5% yeast extract contained in Petri dishes were inoculated on an agar-xylan, the temperature of 28 °C and 37 °C in BOD for subsequent selection of crops for the production of xylanase using xylose as carbon source, evaluated the final pH of the net metabolic biomass and the effect of pH and temperature on xylanolytic activity by quantifying the reducing sugars (DNSA). All cultures grown on solid medium, however 12 formed halo of degradation, being selected for submerged cultivation. Most xylanolytic activity in liquid medium, was obtained by *T. cutaneum* URM4789 with 24.25 U/mL. The final pH of the metabolic net ranged from 6.0 to 7.5, except for the sample *T. cutaneum* URM572 which the pH decreased from 6.0 to 4.65, the mean fungal biomass was 0.53 g and is not evidence of a relationship between the xylanolytic activity and the pH values and dry weight. *T. cutaneum* URM4789 showed xylanolytic activity at pH 6.0 sodium acetate at 60 °C. This isolate demonstrated the potential biotechnological. It is suitable for optimization studies of the conditions of production of xylanases.

Key words: *Trichosporon*, characterization and xylanolytic activity, xylanase

INTRODUÇÃO

Xilanases são enzimas hidrolíticas que degradam xilana, principal componente da hemicelulose, heteropolisacarídeos que formam uma cadeia de β -1-4 ligada à resíduos de xilopirranose (Meshram *et al.*, 2008). As hemiceluloses são o segundo recurso renovável mais abundante, só ultrapassado por celulose (Sunna, 1997; Mayorga *et al.*, 2005). As enzimas que constituem o sistema xilanolítico e que desempenham papel principal na despolimerização de xilana são endoxilanases (1,4- β -xilano-hidrolase D-xilana) e β -xilosidases (β -D-xilohidrolase xilosídeo). Diversas enzimas acessórias, como α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosidase, arabinofuranohidrolase), α -glucuronidase (α -D-glucuronidase), acetilxilana esterase, ácido ferúlico esterase e ácido p-cumárico esterase também são necessários para a hidrólise de várias xilanas (Saha e Bothast, 1999).

Uma variedade de microrganismos é relatada como produtores de xilanases, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo os fungos produtores mais eficientes. A produção destas enzimas por linhagens fúngicas é mais vantajosa, pela facilidade de extração da enzima pela indústria, uma vez que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são secretadas para o meio externo, o que elimina a etapa de rompimento celular (Haltrich *et al.*, 1996; Fengxia *et al.*, 2008).

O gênero *Trichosporon* Behrend inclui leveduras com características morfológicas distintas, produzem pseudomicélio que se desarticulam e originam artroconídios e células brotantes (Ribeiro *et al.*, 2008).

A importância de xilanases em processos industriais é comprovada pelo número de pedidos de patente em relação a este grupo de enzimas. Em 2007 pesquisadores, norte americano e europeus registraram 1.153 e 1.003 patentes de xilanases, respectivamente. Xilanases têm sido aplicadas em vários processos industriais, tais como produção de pão (Camacho e Aguiar, 2003), extração e clarificação de polpa de suco (Polizeli *et al.*, 2005), refinaria e têxtil (Brühlmann *et al.*, 2000). No entanto, a principal aplicação de xilanases está no papel e celulose, onde são utilizados no pré-tratamento prévio ao clareamento (Bajpai *et al.*, 2006). O tratamento enzimático com xilanases reduz a quantidade de cloro necessária neste processo (Parachin *et al.*, 2009).

O objetivo do presente estudo foi selecionar isolados de *Trichosporon* em meio sólido e em fermentação submersa para a produção de xilanases mantidas na Micoteca URM.

Materiais e métodos

Microrganismos

Para realização do estudo, foram utilizados 20 isolados de gênero *Trichosporon* da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, mantidos em ágar Sabouraud adicionado de 0,5% de extrato de levedura (Lacaz *et al.*, 2002) e preservados sob óleo mineral (Sherf, 1943).

Reativação e autenticação taxonômica das culturas

A reativação das culturas preservadas sob óleo mineral foi obtida através da transferência de fragmento da colônia do fungo para um tubo contendo caldo glicosado, mantidas a 28 °C. O inóculo foi repicado para o meio de crescimento específico, ágar Sabouraud contendo 0,5% de extrato de levedura (SYE). A cultura foi estudada em relação às características morfológicas, fisiológicas e seguiu os procedimentos padrão (Barnett *et al.*, 2000; Hoog *et al.*, 2000).

Condições de crescimento

As culturas de *Trichosporon* foram cultivadas em SYE em temperatura de 28 °C, em tubos de ensaio, por um período de até sete dias. Após, foram repicadas para o centro de placas de Petri contendo o referido meio para confecção de disco de ágar micélio.

Seleção em meio sólido

Discos de 5 mm foram retirados e inoculados no centro de cada placa, contendo meio ágar xilana (meio adicionado com xilana 2,5 g/L), mantidas a 28 °C e 37 °C em incubadora tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (TECNAL TE424, Piracicaba - Brasil), durante 7 dias (Nenawe *et al.* 2006). Posteriormente as placas foram coradas com 0,5% de vermelho Congo em etanol (p/v), e reveladas com solução aquosa de NaCl 1M. A detecção de xilanase foi observada através da zona amarela ao redor das colônias,

este ensaio foi realizado em triplicata. As culturas que apresentaram halo de degradação foram selecionadas para cultivo submerso.

Cultivo submerso

O meio de cultura foi preparado de acordo com Liu *et al.* (1998) com modificações (g/L): extrato de levedura, 5g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4g; KH_2PO_4 , 1 g; CaCl_2 , 0,02 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,89 g e 10 g de xilose como única fonte de carbono com pH final de 6,0. Frações de 50 ml do meio de cultura foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL autoclavados durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm. Posteriormente foram inoculados com discos de 5 mm crescido em meio SYE. Os frascos foram agitados a 160 rpm e 32 °C incubados em agitador orbital (TECNAL TE424, Piracicaba - Brasil), por até 5 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação do pH final do líquido metabólico e da Biomassa

O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro (CELAB 21-22µm) para determinação do pH final do líquido metabólico e da atividade xilanolítica, e a massa micelial foi lavada com água destilada esterilizada e seca a 105 °C “overnight” até peso constante.

Atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com Yan *et al.* (2008), utilizando-se solução de substrato, composta de 1,0% (p/v) xilana Birchwood diluída em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0). A mistura contendo 0,9 mL de solução substrato e 0,1 mL de extrato enzimático foi incubada a 50 °C por 60 min. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) (Miller, 1959), utilizando a xilose como o açúcar padrão. Uma unidade (U) de atividade xilanolítica foi definida como a quantidade de 1µmol de açúcares redutores liberados por minuto (equivalentes xilose). A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina (BSA)

como padrão. A atividade xilanolítica final foi calculada após subtração da xilose presente no meio a partir da determinação dos açúcares redutores totais.

Efeito do pH e temperatura sobre a atividade xilanolítica

O efeito do pH foi determinado por avaliação dos resultados de atividade enzimática obtidos a 50 °C em diferentes valores de pH, utilizando os tampões: citrato fosfato de sódio 0,05 M pH 2,6 a 4,2, acetato de sódio 0,05 M pH 4,8 a 6,0, fosfato de sódio 0,05 M pH 6,5 a 7,5, Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 a 9,0, e carbonato de sódio 0,05 M pH 9,4 a 10,6, incubados por 1 hora. O intervalo de variação do pH foi de 0,5. O efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase foi verificado pela incubação do extrato enzimático em temperaturas variando de 20 a 80 °C com faixa de variação de 10 °C, por um período de 1 hora. Posteriormente a atividade enzimática foi verificada utilizando o pH ótimo (previamente determinado).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, de acordo com Yan *et al.* (2008) modificando alguns tampões.

Resultados e discussão

Todas as 20 culturas preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM foram viáveis e mantiveram as características morfo fisiológicas, confirmando a espécie depositada.

Dentre as 20 amostras testadas em meio sólido (teste qualitativo) foi observado crescimento em todas as placas quando mantidas a 28 °C e 37 °C em BOD, entretanto em 12 isolados, a 37 °C, foram constatados a presença de halo de degradação ao redor das colônias. Destas, 7 eram isolados de amostras clínicas (58,4%), 2 do solo (16,7%), 1 do ar (8,3%), 1 de penas de aves (8,3%) e 1 goma de mandioca (8,3%) (Quadro 1). Os 12 isolados que formaram halo, foram testados em cultivo submerso.

Quadro 1. Avaliação da capacidade de degradação de xilana por espécies de *Trichosporon*, pelo crescimento ágar-xilana nas temperaturas de 28 °C e 37 °C, em BOD durante 7 dias.

Registro URM	Espécies	Ano de estocagem	Substrato/procedência	Crescimento 28°C	Crescimento 37°C
4440	<i>Trichosporon aquatile</i> L. R. Heedrick & Dupont	2002	Solo	+	++
572	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	1955	Isolado clínico	+	++
573	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	1955	Isolado clínico	+	+
4250	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2000	Sangue	+	++
4251	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2000	Sangue	+	++
4437	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2002	Solo	+	+
4789	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2004	Goma mandioca	+	++
4846	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2004	Ar	+	++
4973	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	Secreção vaginal	+	++
5003	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	Penas de ave	+	++
5196	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2005	Ração	+	+
5287	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2006	Mucosa labial	+	+
5397	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2007	Sangue	+	+
5743	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2007	Sangue	+	++
5781	<i>T. cutaneum</i> Beurmann et al.	2008	Escamas epidermicas	+	+
4488	<i>T. dulcitum</i> (Berkhout) Weijman	2002	Solo	+	++
4486	<i>T. gracile</i> M. T. Smith (Guého et al.)	2002	Solo	+	+
5973	<i>T. inkin</i> (Oho & Ota) do Carmo-Souza & Van Uden	2009	Urina - Imunodeprimido	+	++
5975	<i>T. ovoides</i> (Behrend)	2009	Escamas ungueais	+	+
4259	<i>T. pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	2000	Secreção orofaríngea	+	++

+ = Crescimento, ++ = Halo de degradação.

Entre os 12 isolados testados para a produção de xilanases em cultura submersa, a amostra *T. cutaneum* URM4789 isolada de goma de mandioca apresentou atividade xilanolítica de 24,25 U/mL, bastante superior as demais espécies e isolados de *Trichosporon* estudados (Figura 1).

Determinação do pH final do líquido metabólico e da Biomassa

Todos os líquidos metabólicos das culturas, apresentaram um ligeiro aumento do pH no intervalo de 6,0 a 7,5, exceto para a amostra *T. cutaneum* URM572 cujo pH diminuiu de 6,0 para 4,65. A média da biomassa fúngica foi de 0,53 g (Figura 1). Não foi evidenciada uma relação entre a atividade xilanolítica e os valores de pH e do peso seco.

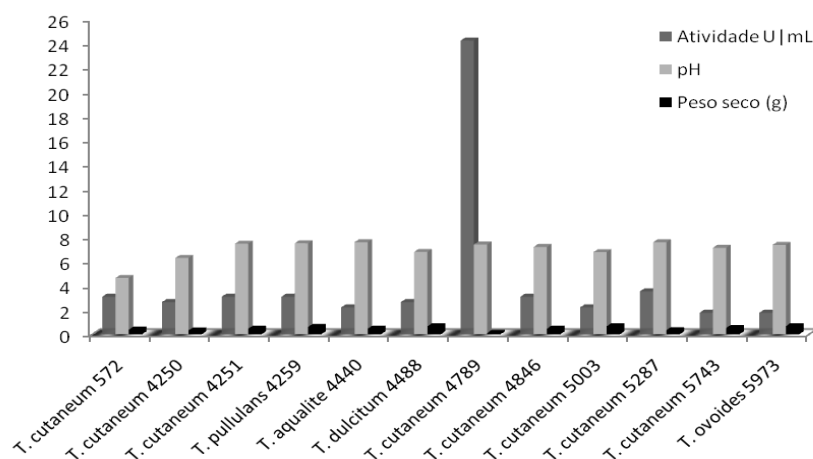


Figura 1. Atividade xilanolítica, pH do extrato bruto e biomassa de espécies de *Trichosporon* após 5 dias de fermentação em cultivo submerso.

Abdel-Sater e El-Said (2001) estudaram a degradação da xilana por fungos filamentosos utilizando meio sólido, ágar xilana, os resultados revelaram que 93,3% dos isolados testados foram capazes de degradar a xilana, sendo a maior degradação apresentada por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

Narayan e Sallan-Uddin (2004) selecionaram fungos para a produção de xilanase, usando meio sólido, testaram 5 amostras de *Paenibacillus* sp. isoladas de solo e água do campus da Universidade Rajshahin, Maharchandi e Vila Benodpurn de Rajshahin. Todas as amostras apresentaram crescimento e zona de degradação ao redor das colônias.

Beneditte (2009) trabalhando com o fungo termofilo FCUP1 e utilizando xilose como fonte de carbono, obteve atividade xilanolítica máxima de 0,574 U/mL, valor inferior ao obtido em nosso estudo.

Stevens e Payne (1977) investigaram o efeito das condições de crescimento na produção de celulase e xilanase em leveduras do gênero *Trichosporon* e compararam a atividade com *Trichoderma viride* e *Myrothecium verrucaria*. As cepas seguintes: *T. cutaneum* YI, *T. cutaneum* G3I, *T. pullulans* CBS2532 e *T. pullulans* C35 foram testadas para a produção de xilanase e todas apresentaram atividade xilanolítica nos filtrados, com maior atividade para o isolado de *T. pullulans* CBS2532 com 72 U/mg.

Liu *et al.* (1998), trabalhando com *T. cutaneum* SL409, obtiveram resultados de atividade xilanolítica acima de 14,3 U/mL em 30 e 48 horas, utilizando xilose como fonte de carbono.

A produção de xilanase por *T. cutaneum* URM4789, utilizando xilose e extrato de levedura 0,5%, como matérias-primas, apresentou atividade total máxima de 24,25 U/mL e atividade específica de 418,82 U/mg apresentando uma atividade enzimática significativa quando comparado aos descritos na literatura para outras espécies de *Trichosporon cutaneum* SI409 com 14,3 U/mL (Liu *et al.*, 1998), *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 com 17,0 U/mL (Damaso *et al.*, 2000), *Aspergillus awamori* com 30,0 U/mL (Lemos *et al.*, 2000), *Bacillus circulans* D1 com 22,5 U/mL (Bocchini *et al.*, 2002) e *Streptomyces actuosus* A-151 10,3 U/mL (Wang *et al.*, 2003), sob diferentes condições de crescimento e de produção enzimática.

Efeito do pH e temperatura sobre a atividade xilanolítica

O efeito do pH na atividade xilanolítica apresentou ótima atividade em pH 6,0 em tampão acetato de sódio 0,05 M (Figura 2-a), valor que está de acordo com os dados obtidos na literatura numa faixa de 5,0 a 9,0 para *Paecilomyces thermophila* J18 (Yang *et al.*, 2006), *P. thermophila* (Li *et al.*, 2006), *Chrysosporium lucknowense* (Ustinov *et al.*, 2008).

Em relação ao efeito da temperatura, verificou-se que a atividade xilanolítica é maior a 60 °C (Figura 2-b), corroborando com os resultados obtidos por Lee *et al.* (2009) que estudando as condições para atividade xilanolítica ótima por fungos da classe Basidiomycota, obtiveram temperatura ótima a 80 °C.

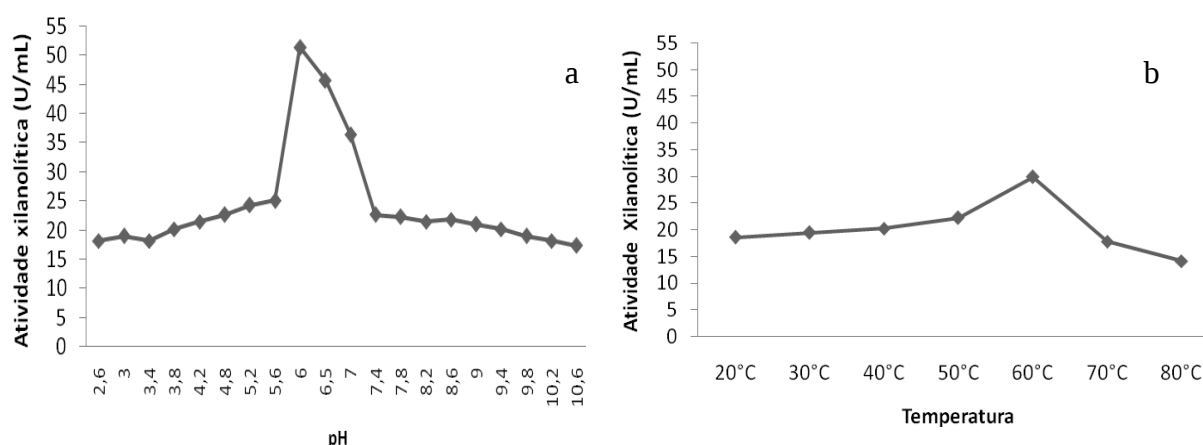


Figura 2. Efeito do pH (a) e da temperatura (b) na atividade xilanolítica (U/mL) do isolado de *T. cutaneum* URM4789.

Yang *et al.* (2006), utilizaram *Penicillium thermophilum* para produção de xilanase, utilizando palha de trigo, como fonte de nitrogênio, obtiveram atividade de 18,58 U/g, depois de otimizada a produção. A xilanase exibiu melhor atividade original, a 70 °C por 4 h em pH 7,0-8,0.

Benedetti (2009) obteve valor ótimo para pH 5,0 e temperatura ótima 60 °C da xilanase produzida pelo fungo FCUP, sendo estes valores semelhantes aos obtidos em nosso trabalho.

Conclusões

Dos vinte isolados testados, todos apresentaram crescimento em meio sólido; em meio líquido, todas as culturas testadas produziram xilanases. Não houve relação entre os valores de pH e o peso seco da biomassa fúngica com a atividade enzimática. Maior atividade xilanolítica foi obtida por *Trichosporon cutaneum* URM4789, 24,25 U/mL, atividade bastante superior aos valores obtidos com as demais culturas testadas. A melhor temperatura e pH para a atividade enzimática foram 60 °C e 6,0. *Trichosporon cutaneum* URM4789 demonstrou potencialidades biotecnológicas, sendo indicado para estudos de otimização das condições de produção de xilanases.

CAPÍTULO 3

Produção de xilanases por *Trichosporon cutaneum* URM4789¹

O. C. Souza*¹, T. S. Porto², M. A. Sousa¹, C. M. Souza-Motta¹, O. M. C. Magalhães¹

¹Departamento de Micologia - Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária- CEP: 60570-420- Recife- PE- Brasil- Email: olimicomed@yahoo.com.br

²Departamento de Morfologia e Fisiologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹ Trabalho a ser submetido para publicação na Biochemical Engineering Journal.

RESUMO

A xilana é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-xilopiranosil interagidos entre si por ligações β -1,4, sendo o principal componente hemicelulósico depositado durante a fase de diferenciação do xilema. Os constituintes mais comuns encontrados na cadeia principal da xilana são resíduos de acetil, arabinofuranosil e/ou glucuronil. Baseado nos substituintes comuns encontrados na cadeia principal, as xilanas são categorizadas como homoxilana linear, arabinoxilana, glucuroxilana e glucuroarabinoxilana. O gênero *Trichosporon* apresenta células de leveduras e micélio verdadeiro, que se desarticulam formando artroconídios. *T. cutaneum* URM4789 demonstrou potencialidades biotecnológicas, indicado para estudos de determinação das melhores condições de produção de xilanases. O estudo de produção foi conduzido utilizando planejamento fatorial completo (2^4), onde foram avaliados a temperatura, pH, concentração da xilose e do extrato de levedura, nos tempos de 48, 72 e 96 horas. O melhor resultado da atividade xilanolítica foi alcançado no ensaio 13, nas seguintes condições: tempo de 96 horas; concentração de xilose 1,5%; ausência de extrato de levedura; pH 7,0 e temperatura 27 °C, nessas condições foi obtido 65,15 U/mL de atividade xilanolítica. As variáveis, concentração de xilose, temperatura e o pH mostraram efeito significativo sobre a produção xilanolítica.

Palavras chaves: *Trichosporon*, xilanase, otimização produção

ABSTRACT

The xylan is a polysaccharide composed of units of residual β -D-xylopyranosyl interacted with each other by links β -1, 4, and the main component of hemicellulose deposited during the differentiation of xylem. The most common constituents found in the main chain of xylan residues are acetyl, arabinofuranosyl and / or glucuronyl. Based on the common substituents found in the main chain of xylan are categorized as homoxilana linear, arabinoxylan, glucuroxilana and glucuroarabinoxilana. The genus *Trichosporon* has yeast cells and true mycelium, which disarticulate forming arthroconidia. *T. cutaneum* URM4789 demonstrated potential biotechnological studies indicated to determine the best conditions for production of xylanases. The production study was conducted using full factorial design (24), to evaluate the temperature, pH, concentration of xylose and yeast extract, in times of 48, 72 and 96 hours. The best result of the xylanolytic activity was determined in the test 13, the following conditions: time 96 hours, the concentration of xylose 1.5%, absence of yeast extract, pH 7.0 and temperature 27 °C under these conditions was obtained 65,15 U/mL of xylanolytic activity. The variables, xylose concentration, temperature and pH showed significant effect on the production xylanolytic

.

Key words: *Trichosporon*, xylanase, production optimization

INTRODUÇÃO

O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, o qual está presente em todas as camadas da parede celular vegetal na interface entre a celulose e a lignina. A xilana após a celulose é a mais abundante fonte renovável de carbono presente na madeira e resíduos agrícolas (Zanoelo *et al.*, 2004).

É uma molécula heterogênea que consiste de cadeia principal com ligações β -1,4 de polixilose até uma cadeia com ramificações de arabinose, manose, galactose, glicose e ácidos (Maheshwari *et al.*, 2000; Abdel-Sater e El-Said, 2001; Lenartovicz, 2003). Na natureza, o interesse pela hidrólise da xilana se dá pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico. As xilanases fazem parte desse complexo, as quais são responsáveis pela hidrólise catalítica da xilana (Lee *et al.*, 2009).

A maioria das xilanas ocorre como heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substitutos na cadeia do esqueleto principal e em cadeias ramificadas. As homoxilanas, por outro lado, consiste em exclusivamente de resíduos de xilosil. Xilanas de madeira existem como *O*-acetil-4-*O*-metilglucuroxilana em madeira dura ou como arabino-4-*O*-metilglucuroxilana em madeira mole. Existem vários tipos de hemiceluloses disponíveis no mercado, como por exemplo, xilana de madeira dura, xilana de madeira mole, xilana de bétula, xilana de farelo de aveia, xilana de lariço e xilana de gramíneas, entre outras, sendo todas extraídas de diferentes vegetais (Nascimento *et al.*, 2005).

Xilanases são produzidas por diversos microrganismos, entre os quais os fungos são os produtores mais promissores. A maioria dos estudos sobre xilanases realizam caracterização e purificação, no entanto são necessários estudos sobre a otimização das condições de meio de cultivo para a melhoria da produção de xilanases (Li *et al.*, 2007). Para o desenvolvimento adequado do sistema de fermentação, alguns parâmetros devem ser otimizados de acordo com os limites do processo, como pH, temperatura, concentração de substrato e tempo de cultivo (Cui *et al.*, 2009).

As xilanases são enzimas de importante aplicação em diferentes indústrias como as de detergente, têxtil, são utilizadas como base para produção de cereais, na panificação, em aplicações industriais, separação do amido e glúten, as xilanases são rotineiramente utilizadas para melhorar e/ou transformar a qualidade final dos produtos; estabilização da polpa de fruta, na recuperação de aromas, redução da viscosidade, hidrólise das substâncias que impedem clarificação física e química do suco e do vinho.

Na indústria de biocombustível, há um crescente interesse em xilanases para a conversão de biomassa em açúcares fermentáveis. Assim, existe uma contínua busca de xilanases com propriedades ideais para processos específicos, visando a degradação do complexo planta hemiceluloses (Pollet *et al.*, 2009). Este trabalho teve como objetivos determinar as melhores condições de produção de xilanase por *T. cutaneum* URM4789.

Material e métodos

Microrganismos

O isolado de *Trichosporon cutaneum* URM4789, previamente selecionado como bom produtor de xilanase nas condições testadas, foi mantido em ágar Sabouraud, acrescido 5% de extrato de levedura a 28 °C, procedentes da Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Planejamento experimental

Para determinação das melhores condições de produção de xilanases por *T. cutaneum* URM4789 foram estudados os parâmetros: temperatura, pH, concentração de xilose e concentração de extrato de levedura, utilizando planejamento fatorial completo (2^4) (Tabela 1). Foram realizados 16 ensaios para o estudo da produção de xilanases e 4 pontos centrais, os quais possibilitam a análise do erro experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistic 8* (Statsoft inc, 2008).

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de xilanases por *Trichosporon cutaneum* URM4789.

Variáveis	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Extrato de levedura (%)	0	0,75	1,5
pH	5.0	6.0	7.0
Temperatura (°C)	27	32	37
Xilose (%)	0,5	1,0	1,5

Fermentação por cultivo submerso

O experimento foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e com pH ajustado, segundo as condições do planejamento, esterilizados a 120 °C durante 15 minutos, resfriados e inoculados discos de micélio com 5 mm obtidos a partir da colônia central em ágar Sabouraud adicionado de 5% de extrato de levedura e incubados em agitador orbital por 48, 72 e 96 horas a 150 rotações por minuto, incubados em agitador orbital (TECNAL TE424, Piracicaba – Brasil).

Determinação do pH final do líquido metabólico e da Biomassa

O meio fermentado foi filtrado em papel de filtro (CELAB 21-22µm) para determinação do pH final do líquido metabólico e a massa micelial foi lavada com água destilada esterilizada e seca a 105 °C “overnight” por um período de 120 horas, até peso constante.

Atividade enzimática

A atividade xilanolítica foi determinada de acordo com Yan *et al.* (2008), utilizando-se solução de substrato xilana Birchwood 1,0% (p/v), em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0). A mistura contendo 0,9 mL de solução substrato e 0,1 mL de extrato enzimático foi incubada a 50 °C por 60 min. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) (Miller, 1959), utilizando a xilose como o açúcar padrão. A atividade xilanolítica final foi calculada após subtração da xilose a partir da determinação dos açúcares redutores totais por DNSA.

Resultados e discussão

Trichosporon cutaneum URM4789 utilizando xilose como fonte de carbono para produção de xilanases, obteve uma eficiente atividade xilanolítica (AX) como pode ser observado nos resultados dos ensaios 5 e 13 com valores maiores de 40 U/mL em 48 horas (Tabela 2). As xilanases produzidas na fermentação submersa foram analisadas até

96 h e atividade xilanolítica neste tempo foi maior que 40 U/mL em quatro dos ensaios realizados, com destaque para o ensaio 13 com 65,15 U/mL (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados do planejamento experimental para a produção xilanolítica por fermentação submersa (FS) com *Trichosporon cutaneum* URM4789.

Ensaio	T	EL	CX	pH	AX 48h	AX 72h	AX 96h	PS 48h	PS 72h	PS 96h
1	27	0	0,5	5.0	0	0	14,16	0,2	0	0
2	37	0	0,5	5.0	18,61	11,33	10,92	0	0,05	0,04
3	27	1,5	0,5	5.0	7,69	6,07	3,64	0,09	0,09	0,12
4	37	1,5	0,5	5.0	7,69	3,64	23,07	0,07	0,05	0,16
5	27	0	1,5	5.0	40,47	38,44	35,21	0,09	0,02	0
6	37	0	1,5	5.0	20,23	29,54	23,47	0	0,02	0,09
7	27	1,5	1,5	5.0	26,30	7,28	0,40	0,11	0,18	0,09
8	37	1,5	1,5	5.0	4,04	4,45	1,21	0,08	0,07	0,03
9	27	0	0,5	7.0	10,12	20,64	17,40	0,14	0,01	0,09
10	37	0	0,5	7.0	2,43	2,43	3,64	0	0,15	0
11	27	1,5	0,5	7.0	10,52	0	4,45	0,15	0,17	0,15
12	37	1,5	0,5	7.0	1,21	4,85	7,28	0,07	0,04	0
13	27	0	1,5	7.0	45,32	50,18	65,15	0,08	0,22	0,11
14	37	0	1,5	7.0	29,95	25,90	31,56	0,01	0,1	0,08
15	27	1,5	1,5	7.0	17,81	8,90	3,64	0,07	0,15	0,16
16	37	1,5	1,5	7.0	2,02	0	0,40	0,06	0,09	0,11
17 (P)	32	0,75	1,0	6.0	0	3,24	2,83	0	0,12	0,2
18 (P)	32	0,75	1,0	6.0	0	2,83	2,83	0,16	0,04	0,09
19 (P)	32	0,75	1,0	6.0	1,62	5,66	2,42	0,03	0,05	0
20 (P)	32	0,75	1,0	6.0	0,80	3,64	1,62	0,09	0,1	0,12

T-temperatura (°C); EL-extrato de levedura (%); CX-concentração de xilose (%); AX-atividade xilanolítica; PS-peso seco (g). P – ponto central

Neste trabalho, não foi observado efeito do pH final líquido metabólico, que variou de 0,5 a 0,8, na atividade xilanolítica das espécies de *Trichosporon* testadas, da mesma forma que o peso seco da biomassa fúngica, que sofreu uma variação de 0,08 a 0,22 g.

Os resultados obtidos (> 50 U/mL), em alguns dos ensaios, foi maior que o valor encontrado por Li *et al.* (2007) utilizando *Penicillium oxalicum* ZH-30, cujo valor relatado foi de 14,50U/mL e após aumento da escala no processo de fermentação, em fermentador de 15L, obteve atividade de xilanase máxima de 16,11 U/mL após 144 h de cultivo em condições otimizadas.

Em relação às condições de temperatura e pH verificou-se que em geral a temperatura de 27 °C apresentou mais resultados significantes do que na temperatura de

37°C. Comparando-se as condições de pH, verificou-se a proximidade entre muitos dos resultados obtidos em pH 5,0 e 7,0.

Na avaliação estatística do efeito das condições de temperatura e pH na atividade xilanolítica, através da observação do gráfico de Pareto (Figura 1), verificou-se o efeito principal ou de primeira ordem e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre as variáveis respostas (biomassa e atividade xilanolítica), em ordem de magnitude. O comprimento das barras é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos, pois as barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com nível de significância de 95% (Porto, 2008).

Observou-se que, os efeitos significativos das variáveis estudadas, assim como as interações entre estas (Figura 1), a variável concentração de xilose (3) apresentou o maior efeito positivo (95%) sobre o crescimento fúngico, isto é, aumentando a concentração de xilose na composição do meio de cultivo favoreceu o aumento da biomassa. A temperatura, o pH e a quantidade do extrato de levedura apresentaram efeitos negativos, com nível de confiança de 95%. A relação entre a temperatura, a quantidade de xilose e o pH, (1x3x4) interagiram de forma positiva. A interação das demais variáveis em estudo não foram significativas.

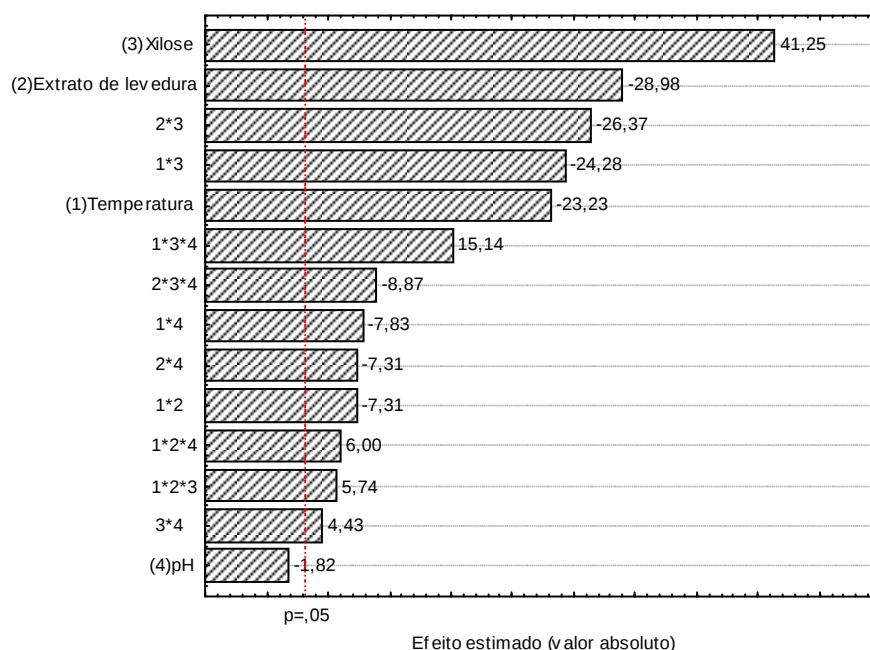


Figura 1- Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 48h de cultivo.

Durante todas as análises foi observado um padrão similar dos efeitos das variáveis, mesmo em tempos de fermentação diferentes. Observou-se na Figura 1 que a concentração do substrato indutor foi o parâmetro mais significativo com 48h de cultivo, tendo efeito positivo, significando que uma maior concentração de xilose proporcionou uma maior produção de enzimas com atividade xilanolítica. O efeito da concentração do extrato de levedura foi significativo e negativo, ou seja, a adição desta a fonte de carbono não favoreceu a produção de xilanases por *T. cutaneum* URM4789, portanto para a produção destas enzimas pode-se cultivar na ausência deste componente. Este comportamento é economicamente viável, pois o extrato de levedura é um substrato caro.

Amani e colaboradores (2007) trabalharam com *Bacillus pumilus*, obtiveram uma maior atividade de xilanases proporcional ao aumento da quantidade de glicose, enquanto que a adição de extrato de levedura não apresentou nenhuma alteração significativa na atividade xilanolítica, este último dado corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo.

O efeito da temperatura também foi significativo e negativo, indicando que uma menor temperatura (27 °C) possibilitou a produção de enzimas xilanolíticas. O efeito da temperatura, assim como a interação significativa entre as concentrações de xilose e de extrato de levedura é melhor compreendido utilizando o gráfico de interpretação geométrica dos efeitos (Figura 2).

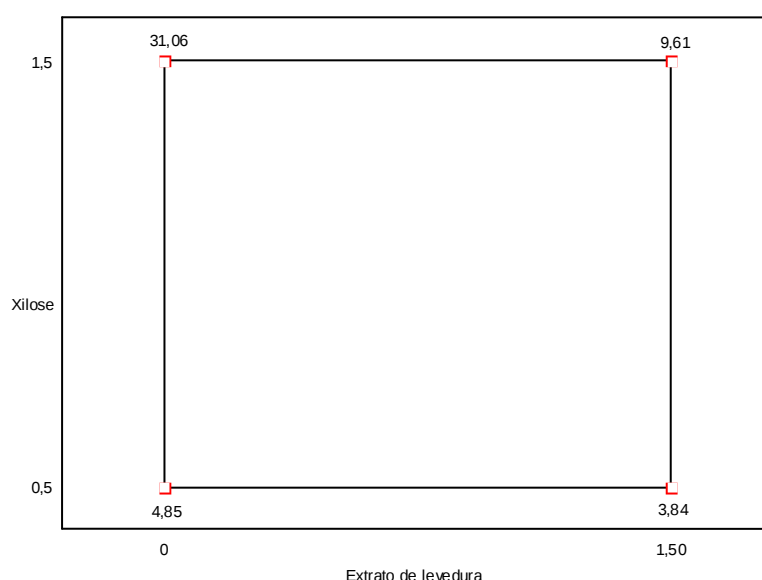


Figura 2- Gráfico de interpretação geométrica dos efeitos da interação entre as concentrações de xilose e de extrato de levedura com 48h de cultivo.

A interação entre as concentrações de xilose e de extrato de levedura apresentou efeito negativo, ou seja, os seus efeitos são contrários, indicando, que uma maior concentração de xilose, associada, a uma menor concentração de extrato de levedura, possibilitou uma melhor produção de enzimas com atividade xilanolítica por *T.cutaneum* URM4789.

Analisando a produção de xilanases com 72 horas de cultivo (Figura 3), verifica-se que a ordem de significância dos efeitos mudou, porém os efeitos apresentam os mesmos sinais, ou seja, a concentração do extrato de levedura e a temperatura apresentaram efeitos negativos e a concentração de xilose positivo, este último resultado sendo corroborado com Kheng e Ibrahim (2005), que trabalharam com *Aspergillus niger* USM A1 I, que alcançou um aumento de 32% na produção de xilanase após adição de xilose, sendo o máximo de atividade de 35 U/g.

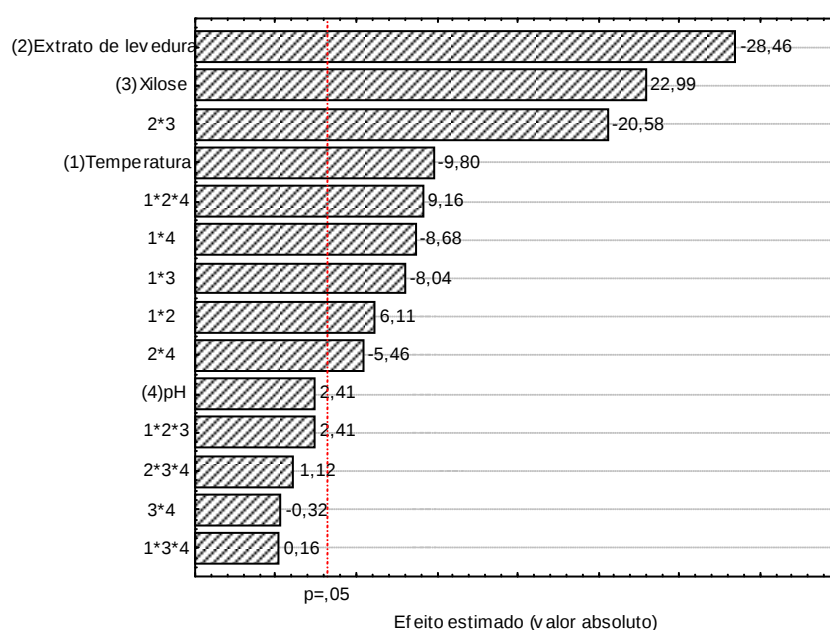


Figura 3- Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 72h de cultivo.

Além dos efeitos já observados, verificamos uma interação significativa entre três variáveis (pH, concentração de extrato de levedura e temperatura). Para realizar a interpretação das interações de terceira ordem, utiliza-se o gráfico cúbico (Figura 4), o qual correlaciona os efeitos das três variáveis em conjunto, com os valores dos efeitos

calculados em cada vértice do cubo. Observa-se que o vértice com o maior valor corresponde à melhor condição de produção de xilanases *T. cutaneum* URM4789, ou seja, sem a adição de extrato de levedura, em pH 7,0 a 27 °C.

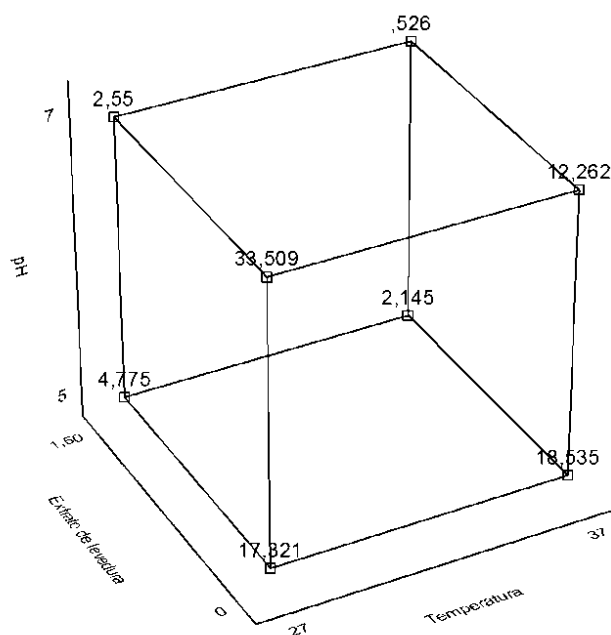


Figura 4- Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração de extrato de levedura e temperatura) tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica.

Análise semelhante foi realizada para a produção com 96 h de cultivo e foi observado o mesmo padrão de efeitos significativos, como pode ser verificado na Figura 5. Porém analisando o processo de produção como um todo, foi claramente demonstrado que esses efeitos não mudaram com o passar do tempo de fermentação, o que é interessante para a indústria, pois independente do tempo os parâmetros que influenciam o processo apresentam comportamento constante.

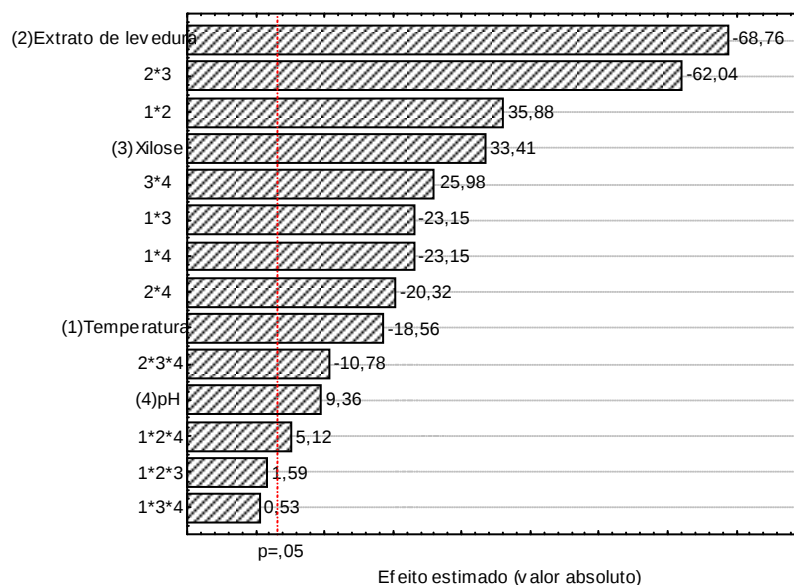


Figura 5- Gráfico de Pareto dos efeitos principais tendo como variável-resposta a atividade xilanolítica com 96h de cultivo.

Um aumento na atividade enzimática foi observado durante a fermentação na melhor condição (Tabela 2, ensaio 13), apresentando uma atividade total de 65,15 U/mL e específica de 90.991,62. Esta melhor condição de produção de xilanases por *T. cutaneum* URM4789, corresponde ao meio com 1,5% de xilose, sem adição de extrato de levedura, pH 7,0 e temperatura de 27 °C. Este resultado foi compatível ao obtido por Azin *et al.* (2007) com *Trichoderma longibrachiatum* cuja maior atividade foi 50 U/mL após 96 horas, e superior aos obtidos por Quinghe *et al.* (2004), Heck *et al.* (2005) e Li *et al.* (2007), que trabalharam respectivamente com *Pleurotus ostreatus* SYJ042 com 24.98 U/mL de atividade, *Bacillus circulans* BL53 com 0.953 Umg/L de atividade, *Penicillium oxalicum* ZH-30 com 16,11 U/ mL de atividade.

Cui e colaboradores (2009) trabalhando com *Penicillium thiersii* ZH-19 obtiveram o melhor resultado (atividade máxima de 80.23 U/mL) para produção de xilanases, após estudo de otimização, em um tempo de fermentação de 126 horas, trinta horas a mais do que o tempo máximo utilizado em nosso estudo, que foi de 96 horas.

Conclusões

Com base nos ensaios experimentais, as melhores condições de produção das xilanases utilizando xilose como fonte de carbono, foram 1,5% de xilose, sem adição de extrato de extrato de levedura a 27 °C em pH 7,0. Nessas condições 65,15 U/mL de atividade enzimática foi obtido em 96 h de fermentação. As variáveis, concentração xilose, temperatura e o pH mostraram efeito significativo sobre a produção xilanolítica. A linhagem *T. cutaneum* URM4789 é uma linhagem promissora para estudos de otimização com perspectiva de utilização em escala industrial.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir:

- O método de preservação sob óleo mineral mostrou-se eficiente para a preservação de culturas de *Trichosporon*.
- Dos vinte isolados testados para a atividade queratinofílica e/ou queratinolítica, todos apresentaram crescimento em meio sólido, no entanto não apresentaram halo de degradação.
- Na caracterização em meio líquido, todas as culturas degradaram a queratina de penas de aves.
- Todas as culturas apresentaram atividade queratinolítica, com destaques para *T. aquatile* 4440URM com produção de 2,65 U/mL, seguido de *T. cutaneum* 5003URM com 2,45 U/mL e *T. cutaneum* 573URM com 2,05 U/mL. *T. aquatile* 4440URM é uma cultura promissora para estudos de otimização das condições de produção de queratinases.
- O pH final do líquido metabólico e a biomassa fúngica não interferiram na atividade queratinolítica.
- *T. aquatile* 4440URM apresentou atividade queratinolítica ótima em pH 8,6 TRIS-HCl a 40 °C.
- Todas as culturas apresentaram crescimento em meio ágar-xilana e 12 apresentaram halo de degradação, sendo selecionados para testes em cultivo submerso.
- Em meio líquido, todas as culturas testadas produziram xilanases com destaque para *T. cutaneum* URM4789 com produção de 24,25 U/mL. *T. cutaneum* URM4789 é uma cultura promissora para estudos de otimização das condições de produção de xilanases.
- O pH final do líquido metabólico e a biomassa fúngica não interferiram na atividade xilanolítica.
- *T. cutaneum* URM4789 apresentou atividade xilanolítica ótima em pH 6,0 acetato de sódio a 60 °C.
- As variáveis, concentração xilose, temperatura e o pH mostraram efeito significativo sobre a produção xilanolítica.

- As melhores condições de produção de xilanases, utilizando o isolado *T. cutaneum* URM4789, foram 1,5% de xilose, sem adição de extrato de extrato de levedura a 27 °C. Nessas condições foi obtido 65,15 U/mL de atividade xilanolítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdell-Hafez, A.L.L., El-Sharouny, H.M.M. 1990. The occurrence of keratinophilic fungi in sewage sludge from Egypt. *Journal Basic Microbiology* 30: 73-79.
- Abdel-Sater, M.A., El-Said, A.H.M. 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industries wastes. *International biodeterioration & biodegradation* 47: 15-21.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M.F. 2000. Keratinophilic fungi and related dermatophytes in pollutes soil and water habitats. *Revista Iberoamericana de Micologia* 51-59.
- Amani, M.D., Ahwany, E.L., Youssef, A.S. 2007. Xylanase production by *Bacillus pumilus*: Optimization by Statistical and Immobilization Methods *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3(6):727-732.
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Hakshmi Priya, T., Annadurai, G. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 639-647.
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Lakshmipriya, T., Annadurai, G. 2007. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource technology* 18: 1298-1303.
- Azin, M., Moravej, R., Zareh, D. 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 801-805.
- Bajpai, P., Anand A., Bajpai P.K. 2006. Yeasts. *Biotechnology Annual Review* 12: 349-378.
- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 2000. Characteristics and identification. . 3° Ed. Cambridge: Editora Cambridge University Press.
- Belfaquih, N., Jaspers, C.H., Kurzatkowski, W., Penninkx, M.J. 2002. Properties of *Streptomyces* sp. endo- β -xylanases in relation to their applicability in kraft pulp bleaching. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 699-705.
- Benedetti, A.C.E.P. 2009. Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase. Tese Doutorado, Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição 108

- Bentubo, H.D.L. 2008. Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos. dissertação Mestrado , Instituto de Ciências Biomédicas (ICB)
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355–383
- Biely, P. 1993. *Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases*. In *Hemicellulose and hemicellulases* ed. Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. p.29-51. London: Portland Press, Apud Flores, M. E., Pérez, R., Huitrón, C. β -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp CHM-1035. *Letters in Applied Microbiology* 24, p. 410-416, 1997.
- Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., Mcleod, A., McIntosh, L., Monem, V., Nitz, M., Rose, D.R., Tull, D., Wakarchuck, W.W., Wang, Q., Warren, R.A.J., White, A., Withers, S.G. 1998. Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochemical Society Transactions* 26: 156-160.
- Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E. & Da Silva, R.. 2002. Optimization of xylanases production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochemistry* 38: 727-731.
- Bon, E.P.S. ***Enzimas em biotecnologia***. 1. ed. São Paulo: Interciência, 2008.
- Borzani, W., Lima, U.A., Aquarone, E., Schmidell, W. 2001. Processos Fermentativos e Enzimáticos - Biotecnologia industrial, 1ª edição. *Editora Edgard Blucher* 3: 377- 378.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brandelli, A., Riffel, A. 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chrysiobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 35-42.
- Braz, S.C.M., Souza-Motta, C.M., Massa, D.M.L., Neves, R.P., Magalhães, O.M.C. 2009. Viabilidade, confirmação taxonômica e caracterização enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 42(1): 63-66.
- Brühlmann, F., Leupin, M., Erismann, K.H., Fiechter, A. 2000. Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *Journal of Biotechnology* 76: 43–50.
- Bueno, L, Gallardo, R. 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 166-168.
- Camacho, N.A., Aguilar, O.G. 2003. Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp and its application in baking.

Biotechnology and Applied Biochemistry 104: 159–171.

- Chen, C., Chen, J.L., Lin, T.Y. 1997. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme Microbial Technology* 21:91-96.
- Chowdhary, A., Ahmad, S., Khan, Z.U. 2004. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. *Indian Journal Medicine Microbiology* 22:16-22.
- Collins T., Gerday C., Felleret G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.
- Cordeiro, E.F. 1997. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos Graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*, dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 122p
- Creighton, T.E. (Ed.). (1989). Protein structure: A practical approach. Oxford, England: Oxford University Press.
- Cui, F., Li, Y., Liu, Z., Zhao, H., Ping, L., Ping, L., Yang, Y., Xue, Y., Yan, L. 2009. Optimization of fermentation conditions for production of xylanase by a newly isolated strain, *Penicillium thiersii* ZH-19. *World Journal Microbiology Biotechnology* 25:721–725.
- Damaso, M.C.T., Andrade, C.M.M., Junior, N.P. 2000. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84(86): 821-34.
- De Toni, C.H., Richter, M.F., Chagas, J.R., Henriques, J.A.P., Termignoni, C. 2002. Purification and characterization of na alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 342-348.
- Dozie, I.N.S., Okeke, C.N., Unaeze, N.C. 1994. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 10: 563-567.
- Ellner, K., Mc Bride, M.E., Rosen, T., Berman, D. 1993, Prevalence of *Trichosporon beigelli* colonization of normal perigenital skin, *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 29: 99-103
- Fagundes, A.A.P.J., Carvalho, R.T., Focaccia R., Fernandez J.G., Araújo H.B.N., Strabelli T.M.V., Kopel L., Lage S.G. 2008. *Trichosporon asahii* an emerging etiologic agent of fungal infection and colonization in heart failure patients in intensive care unit. Case report and literature review. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 20(1) 106-109.

- Farag, A.M., Hassan, M.A. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 85-93.
- Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W. 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology* 99: 5938 – 5941.
- Fennel, D. 1960. Coservation of fungus cultures. *Botanical Review* 26: 79-141
- Figueredo, MB. 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico* 63(1/2): 73-82.
- Friedrich, J., Gradisar, H., Mandin, D., Chaumont, J.P. 1999. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Letters in Applied Microbiology* 28:127-130.
- Friedrich, J., Kern, S. 2003. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 21: 35-37.
- Gradisar, H., Kern, S., Friedrich, J. 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 196-200.
- Gregg, D. J., Boussaid, A., Saddler, J.N. 1998. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresource Technology* 63: 7–12
- Guimarães, L.H.S., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V. C. Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A.B., Polizeli, M.L.T.M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 474-480.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 15-32.
- Gupta, R., Rammani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 21-33.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. 1996. Zupancic S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology* 58: 137 – 161.
- Heck, J.X., Soares, L.H.B., Ayub, M.A.Z. 2005. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation *Enzyme and Microbial Technology* 37: 417–423.
- Hoog, GS., Guarro J., Gené J., Figueras MJ. 2000. Atlas of Clinical fungi. . 2º Ed Netherlands: Editora Centralbureau voor Schimmencultures.
- Katiyar-Sarika; Kushwaha, R.K.S. 2002. Ivasion and biodegradation of hair by house dust

fungi. *International biodeterioration and biodegradation* 50: 89-93.

Kaul, S.; Sumbali, G. 1999. Keratinophilic fungi from poultry farm soils of Jammu, India. *Mycologist* 14(2): 89-91.

Kheng, P.P. and Ibrahim, C.O. 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate *Songklanakarin Journal Science Technology*. 27(2): 325-336.

Kumar, C.G., Malik, R.K., Tiwari, M.P. 1998. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspectives. *Current Science* 75: 1312-1318.

Kushwaha, R.K.S. 1983. The in vitro degradation of peacock feathers by some fungi. *Mykosen*, 26, 324-326.

Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vacarri, E.M., Melo, N.K. 2002. Tratado de Micologia Médica. 9º Ed. São Paulo: Editora Savier.

Lachance, M.A., Starmer, W.T. 2008. The yeast genus *Kurtzmaniella* gen. nov. and description of the heterothallic, haplontic species *Kurtzmaniella cleridarum* sp. nov., the teleomorph of *Candida cleridarum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:520-524.

Langeveld, J.P.M., Wang, J.J., Wield, D.F.M.V., Shih, G.C., Bossers, A., Shih, J.C. 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infect cattle and sheep. *The Journal of Infectious Diseases* 188: 1782-1789.

Lee, J.W., Park, J.Y., Kwon, M., Choi, I.G. 2009. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107(1): 33-37.

Lemos, J.L.S., BON, E.P.S., Santana, M.F.E. & Junior, N.P. 2000. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 31, pp. 206-211.

Lenartovicz, V., Souza, C.G.M., Moreira, F.G., Peralta, R.M. 2003. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 38: 1775-1780.

Li, L., Tian, H., Cheng, Y., Jiang, Z., Yang, S. 2006. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces themophila*. *Enzyme and microbial technology* 38(6): 780-787.

Li, Y., Cui, F., Liu, Z., Xud, Y., Zhao, H. 2007. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1381-1388.

Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (Eds). 2001. Processos

fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher 3: 593pp. (Coleção biotecnologia v.4).

- Lin, X., Inglis, G.D., Yanke, L.J., Cheng, K.G. 1999. Selection and characterization of feather degrading bacteria from conola meal compost. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23: 149-153.
- Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, J., Ma, G. 1998. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SI409. *Process Biochemistry* 33: 331-336.
- Magalhães, A.R., Mondino, S.S.B., Silva, M., Nishikawa, M.M. 2008. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 786-790.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology* 64(3): 461-488.
- Marchisio, V.F., Curetti, D., Bordese, C. 1991. Keratinolytic and keratinophylic fungi in the soils of Papua New Guinea. *Mycopathologia* 115: 113-119.
- Martins, T.S. 2001. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Dissertação (Mestrado Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Maves, R.C., Hale, R.B. 2006. *Trichosporon* Infections. Last Updated
- Mayorga, L.R., Gutiérrez, A.N., Salgado, L.M., Ponce, T.N. 2005. Aislamiento de una clona que contiene un gen de xilanasa a partir de una genoteca de *Cellulomanas flavigena*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 36: 5-9.
- Meshram, M., Kulkarni, A., Jayaraman, V.K., Kulkarni, B.D., Lele, S.S. 2008. Optimal xylanase production using *Penicillium janthinellum* NCIM 1169: A model based approach. *Biochemical Engineering Journal* 40: 348 – 356.
- Micoteca URM. 2009. Histórico. Disponível em: <<http://www.ufpe.br/micoteca/historico.html>>. Acesso em: 20 dezembro 2009.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 538- 542.
- Montesinos, J.L., Obradors, N., Gordillo, M.A., Valero, F., Sola, C. 1996. Effect of nitrogens sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59(1): 25-37.
- Nair, S.G., Sindhu, R., Shashidhar. 2008. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. *Africa Jornal Microbiology Res.* 2: 82-86.

- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S.C. 2004. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds.). *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. London, Elsevier Academic Press: 37-47.
- Nam, G.W., Lee, D.W., Lee, H.S., Lee, N.J., Kim, B.C., Choe, E.A. 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Archives of Microbiology* 178: 538-547.
- Narayan, R., Salah-Uddin, A.T.M. 2004. Screening purification and characterization of xylanase from *Paenibacillus* sp. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7: 372-379.
- Nascimento R.P., d'Avila-Levy, C.M., Souza, R.F., Branquinha, M.H., Bon, E.P.S., Pereira Jr., N., Coelho, R.R.R. (2005). Production and partial characterization of extracellular proteinases from *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 isolated from a Brazilian cerrado soil. *Archives of Microbiology* 184: 194-198.
- Nenawe, S., Lal, R., Kuhad, R.C. 2006. Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. *Current Microbiology* 53: 178-182.
- Neufeld, P. M., Oliveira, P. C. 2008. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 40(3): 167-169.
- Neufeld, P.M., Sarquis, M.I.M. 2003. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. *Revista brasileira de análises clínicas* 35(3): 147-150
- Okafur, J.I., Ada, N. 2000. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. *The Journal of communicable diseases* 32: 300-305.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., Al-Zarban, S.A. 1998. review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*. 66: 1-11.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Papadopoulos, M.C. 1989. Effects of processing on high protein feedstuffs: a review. *Biological Wastes* 29: 123-138.
- Papine, R., Mancianti, F., Grassotti, G., Cardini, G. 1998. Survey of keratinophylic fungi isolated from city park soils of Pisa, Italy. *Mycopathologia* 143:17-23.
- Parachin N.S., Siqueira S., Faria F.P., Torres F.A.G., Moraes L.M.P. 2009. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolates I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B:*

Enzymatic 59: 52-57

- Pinheiro, T.L.F. 2006. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.105.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577–591.
- Pollet, A., Beliën, T., Fierens, K., Delcour, J.A., Courtin, C.M. 2009. *Fusarium graminearum* xylanases show different functional stabilities, substrate specificities and inhibition sensitivities. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 189–195.
- Porto, T.S. 2008. Extração da Ancofato oxidase de *Curcubita maxima* por processo contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas. tese de doutorado em tecnologia bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo, USP, 147.
- Qinghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, N., Cheng, J., Qiugang, M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry* 39: 1561–1566.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Chatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635.
- Reguly, J.C. 2000. Biotecnologia dos processos fermentativos. Vol. 3. Editora e Gráfica Universitária-UFPEL. Pelotas/RS.
- Ribeiro, M.A., Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M. 2008. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 221-225.
- Riffel, A., Ortolon, A., Brandelli, A. 2003. De-hairing activity of extracellular protease produced by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 78: 855-859.
- Ruegger, M.J.S., Towk-Tornisielo, S.M.T. 2002. Xylanase production by filamentous fungi isolated from soil of the ecological station of Juréia-Itatins, SP, Brazil *Holos environment* 185-194.
- Saha, B.C., Bothast, R.J. Enzymology of xylan degradation. In: Imam, S.H., Greene, R.V., Zaidi, B.R. 1999. Biopolymers: Utilizing Nature's Advance Materials. *American Chemical Society* 167–194.

- Said, S.; Pietro, R.C.L.R. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 413
- Sales, M.R., Cavalcanti, M.T.H., Filho, J.L.L., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F. 2008. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* *Pesquisa agropecuária brasileira* 43(2): 285-288
- Schrooyen, P.M.M., Dijkstra, P.J., Oberthur, R.C., Bantjes, A., Feijen, J. 2001. Partially carboxyethylated feather keratin. 2. Thermal and mechanical properties of films. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 49: 221-230.
- Seyis, I., Aksoz, N. 2005. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55: 115-119.
- Sherf, A.F. 1943. A method for maintaining *Phytophthora sepedonica* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology* 33: 330-332.
- Silva, R.B.O., Fusco-Almeida, A.M., Matsumoto, M.T., Baeza, L.C., Benaducci, T., Mendes-Giannini, M.J.S. 2008. Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of Intensive Care Units patients / Diversidade genética e suscetibilidade a antifúngicos de *Trichosporon asahii* isolado de pacientes de Unidades de Terapia Intensiva. *Brazilian Journal Microbiology* 39(3):585-592.
- Silva-Neves, K.C., Porto, A.L.F., Teixeira, M.F.S. 2006. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazonica* 36(3): 299–306
- Smith, D., Onions, A.H.S. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. IMI, Technical Handbooks N° 2. 2. ed. Egham: CAB International, 122 p.
- Sousa, M.A. 2008. Queratinases produzidas por fungos isolados de ambientes de piscinas de parques aquáticos do Recife-PE. dissertação de mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 104.
- Souza, O.C. 2007. Viabilidade e confirmação taxonômica de culturas de dermatófitos preservadas por liofilização na Micoteca URM. *monografia de especialização em micologia* – CCB-UFPE, 35.
- Statsoft inc. statistica (data analysis software systems) version 8.0, 2008.
- Stevens, B.J.H., Payne, J. 1977. Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of General Microbiology* 100: 381-393.
- Subramaniyan, S., Prema, P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22(1): 33-64.

- Sugita, T., Nishikawa, A., Shinoda T. 1998. Rapid Detection of Species of the Opportunistic Yeast *Trichosporon* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 36(5): 458-1460.
- Sunna, A., Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* 17: 425-430.
- Tatineri, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.V., Mangamoori, L.N. 2007. Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp.7. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141: 187-201.
- Treva, M.D.T., Boffey, S., Goulding, K.H., Stanburyk, P. 1990. *Biotechnology: Principios biotecnológicos*. Editorial Acirbia, S.A. Saragoza – España, 284p.
- Ulfig, K., Guarro, J., Cano, J., Gené, J., Vidal, P., Fegueras, M.J., Lukasik, W. 1997. The occurrence of keratinolytic fungi in sediments of the river Tordera (Spain). *FEEMS Microbial Ecology* 22:111-117.
- Ustinov, B.B., Gusakov, A.V., Antonov A.I., Sinitsyn, A.P. 2008. Comparison of properties and mode of action of six secreted xylanases from *Chrysosporium lucknowens*. *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2008) 56–65
- Vanbreuseghem, R. 1952. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 32: 173-178.
- Vieira, D.S., Degre L. 2001. Caracterização dos sítios ativos de um par mesofílico-termofílico de xilanases da família 11. Um estudo das ligações de hidrogênio intramoleculares por simulação molecular. *Journal of Molecular Modeling* 7, 306.
- Vignardet, C.; Guillaume, Y.C.; Mechel, L.; Friedrich, J.; Millet, J. 2001. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *International Journal of Pharmaceutics* 224: 115-122.
- Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A.C., & Chai, Y.D. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 917-925.
- Wawrzekiewicz, K., Wilk, T., Lobarewski, J. 1991. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. *Mycopathologia*, 114: 1-8.
- Wong, K.K.Y., Saddler, J.N. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. *Critical Reviews in Biotechnology* 12: 413-435.
- Yan Q., Hao S., Jiang Z., Zhai Q., Chen W. 2008. Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58:72-77.
- Yang, S.Q., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Li L.T., Tian, H.M., Wang, Y.Z. 2006. High-level of

xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces themophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 97: 1794-1800.

Zanoelo, F.F., Polizeli, M.L.T.M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. 2004. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 170-176.

Zurita, J., Hay, R.J. 1987. Adherence of dermatophyte microconidia and artronconidia to human keratinocytes *in vitro*. *Journal of Investigative Dermatology* 89: 529-534, 1987.