

GISELLE MARIA MACIEL

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES  
POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA  
DE AÇÚCAR E FARELO DE SOJA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Porto Souza Vandenberghe

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Curitiba

**2006**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Geraldo e Arlete  
por todo amor, incentivo e carinho  
dedicados durante minha vida.*

*Ao meu marido Charles pelo seu  
apoio, paciência e amor  
incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Porto de Souza Vandenberghe por toda disposição em ensinar, ajudar nas mais diversas situações e pela excelente orientação na realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pelo exemplo de dedicação, pela co-orientação e sugestões valiosas.

À minha família por todo apoio, carinho e atenção que foram dedicados durante a minha vida pessoal e profissional. Um agradecimento especial à minha avó Celina, minha irmã Vanessa, tias Nancy e Marilda e à minha prima Rosilda.

À minha amiga e prima Dayane pelo seu companheirismo, apoio e alegria.

À Bernadete e ao Nereu pela amizade, apoio, carinho e instruções preciosas.

À equipe Xilanase: Ricardo, Bianca e Tahiana, que tanto contribuíram com sua inteligência e dedicação para a realização deste trabalho. Vocês foram fundamentais.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia: Mitiyo, Cristine, Andréa, Flávera, Michele, Cíntia, Herta pelas dicas, conversas, materiais, caronas e “cafezinhos”.

Ao Programa de Pós-Graduação Processos Biotecnológicos pela oportunidade de mostrar meu trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro para a minha total dedicação.

À todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho e principalmente à Deus que me permitiu a concretização de mais uma etapa em minha vida.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS .....	3
2.2. XILANASES.....	5
2.2.1. <i>Mecanismo de ação</i> .....	5
2.2.2. <i>Endo-(1,4)-β-xilanases</i> .....	7
2.2.3. <i>Produção de xilanases</i> .....	10
2.2.4. <i>Fatores que influenciam a produção de xilanases</i> .....	11
2.2.4.1. Xilanases fúngicas.....	12
2.2.4.1.1. Oxigenação .....	12
2.2.4.1.2. pH e temperatura .....	13
2.2.4.1.3. Composição do meio.....	13
2.2.4.1.4. Umidade e $a_w$ .....	14
2.2.5. <i>Aplicações</i> .....	15
2.3. FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	17
2.3.1. <i>Tipos de FES</i> .....	18
2.3.2. <i>Fermentação no estado sólido x Fermentação submersa</i> .....	18
2.3.3. <i>Aplicações da FES</i> .....	20
2.3.4. <i>Fatores que afetam a FES</i> .....	23
2.3.4.1. Atividade de água e umidade .....	23
2.3.4.2. Temperatura .....	24
2.3.4.3. pH .....	25
2.3.4.4. Aeração .....	25
2.3.4.5. Microrganismos .....	26
2.4. SUBSTRATO E SUPORTE.....	27
2.4.1. <i>Hemicelulose</i> .....	28
2.4.2. <i>Bagaço de cana</i> .....	30
2.4.3. <i>Farelo de Soja</i> .....	32

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1. OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	35
3.2. SELEÇÃO QUALITATIVA.....	35
3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS .....	36
3.4. EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE/XILANA DO BAGAÇO DE CANA .....	37
3.5. PREPARAÇÃO DO INÓCULO .....	38
3.6. CONDIÇÕES INICIAIS DA FES E SELEÇÃO QUANTITATIVA .....	38
3.7. CURVA DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE .....	39
3.8. EXTRAÇÃO DA ENZIMA.....	40
3.9. ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	40
3.10. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS .....	40
3.10.1. <i>Otimização pH, temperatura e umidade</i> .....	41
3.10.2. <i>Otimização pH e umidade</i> .....	42
3.10.3. <i>Otimização da extração da enzima</i> .....	43
3.10.4. <i>Efeito da composição química – solução mineral</i> .....	44
3.10.5. <i>Concentração dos sais</i> .....	45
3.11. ESTUDO DE CONTROLE DO PH INICIAL .....	45
3.12. EFEITO DE ALGUNS ADITIVOS NA PRODUÇÃO DA XILANASE EM FES .....	46
3.13. ESTUDO DE SECAGEM DO MATERIAL FERMENTADO .....	46
3.14. PROPRIEDADES DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	47
3.14.1. <i>Caracterização enzimática</i> .....	47
3.14.2. <i>Estudo da estabilidade em relação ao pH e temperatura</i> .....	47
3.14.3. <i>Efeito do congelamento sobre a atividade de xilanase</i> .....	48
3.14.4. <i>Efeito da presença de metais</i> .....	48
3.14.5. <i>Determinações cinéticas enzimáticas</i> .....	48
3.15. CINÉTICA FINAL DE PRODUÇÃO EM FRASCOS ERLLENMEYER .....	48
3.16. FERMENTAÇÃO EM COLUNA AERADAS.....	49
3.16.1. <i>Otimização da aeração e umidade em colunas</i> .....	50
3.17. LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO .....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
4.1. OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS E SELEÇÃO QUALITATIVA.....	52
4.2. CONDIÇÕES INICIAIS DA FES E SELEÇÃO QUANTITATIVA .....	53
4.3. CURVA DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE .....	57

4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS .....	59
4.5. EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE/XILANA DO BAGAÇO DE CANA.....	61
4.5.1. <i>Teste qualitativo com xilana extraída do bagaço de cana</i> .....	62
4.6. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS .....	63
4.6.1. <i>Otimização pH, temperatura e umidade</i> .....	63
4.6.2. <i>Otimização pH e umidade (segundo estudo)</i> .....	66
4.6.3. <i>Otimização da extração da enzima</i> .....	69
4.6.3.1. Efeito da escolha do solvente no processo de extração.....	69
4.6.3.2. Delineamento experimental para extração .....	70
4.6.4. <i>Efeito da composição química (solução mineral) e concentração de sais</i> .....	77
4.7. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH INICIAL .....	82
4.8. EFEITO DE ALGUNS ADITIVOS NA PRODUÇÃO DA XILANASE EM FES .....	82
4.9. ESTUDO DE SECAGEM DO MATERIAL FERMENTADO .....	83
4.10. PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO.....	87
4.10.1. <i>Caracterização enzimática</i> .....	87
4.10.2. <i>Estudo da estabilidade enzimática em relação à temperatura</i> .....	89
4.10.3. <i>Estabilidade do extrato bruto em relação ao pH</i> .....	96
4.10.4. <i>Efeito do congelamento do extrato bruto</i> .....	97
4.10.5. <i>Efeito da presença de alguns íons</i> .....	98
4.10.6. <i>Determinações cinéticas enzimáticas</i> .....	99
4.11. CINÉTICA FINAL DE PRODUÇÃO EM FRASCOS ERLNMEYER .....	101
4.12. LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO .....	103
4.13. FERMENTAÇÃO EM COLUNA AERADAS.....	105
4.13.1. <i>Otimização da aeração e umidade em colunas</i> .....	105
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Aspectos positivos e negativos da FES.....	19
TABELA 2.2. Aplicações da FES em diferentes setores econômicos.....	21
TABELA 2.3. Aplicações recentes da Fermentação no Estado Sólido.....	22
TABELA 3.1. Proporções de Bagaço de cana e Farelo de soja estudados em FES.....	37
TABELA 3.2. Variáveis e níveis do delineamento experimental para otimização das variáveis umidade, pH e temperatura.....	42
TABELA 3.3. Níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial completo ( $3^{2-0}$ ) para otimização do pH e umidade.....	43
TABELA 4.1. Resultados da seleção quantitativa em FES. As atividades enzimáticas estão expressas em UI/mL.....	53
TABELA 4.2. Índice enzimático (placa contendo xilana 0,2% e agar) e atividade das xilanases produzidas pelas cepas selecionadas qualitativamente.....	54
TABELA 4. 3. Porcentagem granulométrica dos substratos.....	59
TABELA 4. 4. Características físico-químicas do Bagaço de cana e Farelo de soja.....	60
TABELA 4. 5. Índices enzimáticos dos testes em placa com xilana extraída do bagaço de cana (BC) e xilana padrão (Sigma).....	62
TABELA 4. 6. Análise de variância das respostas de pH, umidade e temperatura.....	65
TABELA 4. 7. Equação de regressão para as variáveis significativas temperatura e umidade.....	66
TABELA 4. 8. Níveis de pH e umidade e atividades de xilanase.....	67
TABELA 4.9. Análise de variância das respostas de pH e umidade.....	68
TABELA 4.10. Resultados da aplicação de diferentes solventes na extração enzimática.....	69
TABELA 4.11. Níveis e fatores estudados para otimização dos parâmetros de extração da xilanase, apresentando as atividades enzimáticas correspondentes à recuperação.....	71
TABELA 4.12. Valores utilizados para o experimento de otimização da extração de xilanase e as atividades enzimáticas correspondentes.....	73

TABELA 4.13. Equação de regressão dos parâmetros representados pelas concentrações de $\text{CuSO}_4$ e $\text{CoSO}_4$ . .....	80
TABELA 4.14. Análise estatística dos modelos de produção de xilanase em diferentes níveis de concentração de sais.....	80
TABELA 4.15. Comparação da produção de xilanase em vários materiais lignocelulósicos em FES, com diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> . .....	81
TABELA 4.16. Resultados dos testes de ajuste de pH inicial.....	82
TABELA 4.17. Constante k e meia vida da xilanase nos diferentes tratamentos para temperatura de $50^\circ\text{C}$ . .....	91
TABELA 4.18. Constante k para temperatura de $60^\circ\text{C}$ . .....	94
TABELA 4.19. Efeito da liofilização na atividade da xilanase presente em amostras pré-tratadas com Manitol (MT) ou Leite em pó desnatado (LP) em diferentes concentrações. ....	104
TABELA 4.20. ANOVA obtida a partir dos dados de aeração e umidade. ....	106



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Representantes e proporção de participação no mercado mundial de enzimas. ....	4
FIGURA 2. 2. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac - grupo acetil; Arab - L-arabinofuranose; MeGIA - ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil - D-xilose. Fonte: BIELY, 1985. ....	6
FIGURA 2.3. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal, incluindo a hemicelulose. Fonte: DARLING, 2006. ....	29
FIGURA 2.4. Relação de produtos que podem ser obtidos a partir do bagaço de cana de açúcar. FONTE: Cooperval. ....	32
FIGURA 3.1. Fermentações em colunas aeradas. ....	50
FIGURA 4. 1. Regiões mais claras e colônias de microrganismos produtores de xilanase em placas contendo xilana-agar corada com vermelho do congo ( os halos amarelos indicam o consumo de xilana). À esquerda: <i>Aspergillus niger</i> ; À direita: <i>Streptomyces sp.</i> .....	52
FIGURA 4. 2. Perfil de produção de xilanase em relação ao tempo de fermentação (horas), para as três melhores cepas. ....	54
FIGURA 4. 3. Estudo cinético em FES para <i>A. niger</i> LPB 326 (a) e LPB 3 (b), mostrando os valores de atividade enzimática ( $\square$ ) em UI/gms e de pH ( $\bullet$ ) obtidos durante 10 dias.....	56
FIGURA 4. 4. Perfis de atividade de água para <i>A. niger</i> LPB 326 (a) e LPB 3 (b) durante os 10 dias de fermentação. ....	56
FIGURA 4. 5. Curvas de crescimento mostrando em: (a) o número de esporos produzidos ( $\square$ ) e de colônias formadas ( $\bullet$ ) em 192 horas por <i>A. niger</i> LPB 326; (b) gráfico de crescimento em escala logarítmica.....	57
FIGURA 4. 6. Desenvolvimento de <i>Aspergillus niger</i> LPB 326 em relação ao tempo. Fotos em aumento de 100x. ....	58
FIGURA 4. 7. Influência da proporção dos substratos (BC – bagaço de cana e FS – farelo de soja) na produção de xilanase (UI/g de matéria seca). ....	61
FIGURA 4. 8. Gráfico de contorno da otimização de pH e temperatura.....	63
FIGURA 4. 9. Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com $p \leq 0,05$ . ....	64

FIGURA 4. 10. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade e temperatura.....	64
FIGURA 4. 11. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para os valores de pH e umidade na produção de xilanase. ....	68
FIGURA 4. 12. Diagrama de Pareto mostrando os fatores que foram significativos neste primeiro de estudo de otimização de extração. ....	72
FIGURA 4. 13. Gráfico de contorno dos parâmetros tempo (minutos) e volume de solução de extração (mL). ....	72
FIGURA 4. 14. Gráfico mostrando as variáveis significativas em $p \leq 0,05$ .....	74
FIGURA 4. 15. Gráfico de contorno Volume x Agitação.....	75
FIGURA 4. 16. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas das variáveis tempo e volume.....	75
FIGURA 4. 17. Médias dos dados obtidos do primeiro estudo de otimização da extração mostrando atividades da xilanase em UI/mL (volumétrico) e UI/gms (unidades totais).....	77
FIGURA 4. 18. Médias dos dados obtidos do segundo estudo de otimização da extração mostrando atividades da xilanase em UI/mL (volumétrico) e UI/gms (unidades totais).....	77
FIGURA 4. 19. Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para os diferentes sais, mostrando a faixa de 95% de significância ( $p \leq 0,05$ ) na produção de xilanase. ...	78
FIGURA 4. 20. Gráficos de contorno mostrando a região ótima para os sais (ponto central). ....	79
FIGURA 4. 21. Atividade enzimática residual após a secagem em diferentes temperaturas (42, 50 e 80°C). Atividade inicial (0) considerada 100%.....	84
FIGURA 4. 22. Atividade enzimática residual do produto seco em diferentes temperaturas e após 15 dias, conservado em sacos plásticos em temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). ....	85
FIGURA 4. 23. Efeito da temperatura e da presença de cloreto de cálcio durante a secagem na atividade da xilanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> BC. ....	86
FIGURA 4. 24. Efeito da temperatura e da presença de cloreto de cálcio durante a secagem na atividade da xilanase produzida por <i>Aspergillus niger</i> 326. ....	86
FIGURA 4. 25. Avaliação da temperatura e pH ótimos para atividade das xilanases do extrato bruto. ....	88

FIGURA 4. 26. Perfil de atividade enzimática em relação à melhor faixa de pH (5 a 6).....	88
FIGURA 4.27. Perfil de atividade enzimática em relação ao tempo para temperatura de 50°C, com e sem tratamento.....	89
FIGURA 4.28. Inativação térmica da xilanase à 50°C com e sem tratamento. ST – sem tratamento ( $R^2 = 0,97$ ); XP – xilana padrão ( $R^2 = 0,95$ ); XBC – xilana do bagaço de cana ( $R^2 = 0,97$ ).....	92
FIGURA 4. 29. Relação de atividade enzimática e tempo na temperatura de 50°C. ....	93
FIGURA 4.30. Atividade enzimática em relação ao tempo com a ação da temperatura (60°C).....	93
FIGURA 4.31. Inativação térmica da xilanase à 60°C com e sem tratamento. ST – sem tratamento ( $R^2 = 0,98$ ); XP – xilana padrão ( $R^2 = 0,98$ ); XBC – xilana do bagaço de cana ( $R^2 = 0,94$ ).....	94
FIGURA 4. 32. Atividade xilanolítica presente no extrato bruto submetido à pHs diferentes durante um período de até 5 horas.....	96
FIGURA 4.33. Análise do efeito do congelamento na atividade da xilanase presente no extrato bruto sem tratamento (ST) e na presença de xilana extraída do bagaço de cana (XE), xilana padrão Sigma (XP) e glicerol (G).....	98
FIGURA 4. 34. Efeito da adição de alguns íons na atividade da xilanase produzida por <i>A. niger</i> LPB 326. ....	99
FIGURA 4. 35. Efeito da concentração de substrato (xilana tipo birchwood) na atividade da xilanase produzida por <i>A. niger</i> LPB 326 em FES. ....	100
FIGURA 4. 36. Gráfico duplo recíproco para determinar os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e $K_m$ da xilanase a partir da xilana tipo birchwood à 50°C.....	100
FIGURA 4. 37. Evolução da atividade enzimática e pH em relação ao tempo...	101
FIGURA 4. 38. Consumo de açúcares e produção de xilanase durante 7 dias de fermentação com <i>A. niger</i> LPB 326.....	102
FIGURA 4. 39. Perfil de atividade de água em relação ao tempo de fermentação. ....	102
FIGURA 4. 40. Gráfico mostrando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) aeração e umidade, estudados na fermentação em colunas de Raimbault.....	105
FIGURA 4. 41. Gráfico de contorno da taxa de aeração e umidade na fermentação em colunas. ....	106

## Resumo

Foram realizadas fermentações no estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana de açúcar, o qual foi suplementado com farelo de soja, com o objetivo de produção de xilanases, procurando-se inicialmente isolar e selecionar uma cepa fúngica promissora. A partir de um total de 20 cepas, sete foram selecionadas qualitativamente em placas com xilana como única fonte de carbono, onde o corante vermelho do congo revelou os maiores halos de produção de xilanase. Para o teste quantitativo foi selecionado um meio de produção comum a todos os microrganismos. Duas cepas de *Aspergillus niger* obtiveram a melhor produção, e foram submetidas a uma cinética de produção por 10 dias onde foram obtidos alguns parâmetros fermentativos, selecionando-se finalmente a *Aspergillus niger* LPB 326. O substrato foi analisado físico-quimicamente, estudando-se também as proporções ideais de bagaço de cana e farelo de soja a serem utilizadas, além da capacidade de absorção de água. A proporção que melhor induziu a produção da enzima foi de 65/35% para bagaço de cana e farelo de soja, respectivamente, com capacidade máxima de absorção de água de 85% nesta proporção. A partir destes dados iniciou-se a otimização dos seguintes parâmetros fermentativos: pH, umidade, temperatura, solução mineral, concentração dos sais da solução mineral, e extração da enzima. Todas essas variáveis foram estudadas estatisticamente através da metodologia de superfície de resposta. O ajuste de pH inicial mostrou-se não significativo, visto que em outros estudos o pH natural do meio, juntamente com a solução mineral, foi considerado ideal para a produção da enzima de interesse. A umidade ótima ficou em 85% e a temperatura em torno de 30°C. Os sais e as concentrações otimizadas foram: CuSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e CoSO<sub>4</sub> em 0.4 g/l, 1.5 g/l e 0.0012 g/l, respectivamente. Em relação à extração da enzima, as melhores condições foram: 37 mL de solução de extração em 3 g de fermentado, agitação à 133 rpm por 5 minutos, com posterior centrifugação do extrato enzimático à 3500 rpm por 10 minutos. Após a otimização a maior atividade de xilanase obtida foi de 3.099 UI/gms. O efeito de alguns aditivos no meio fermentativo foram estudados, e somente o tratamento com Tween 80 exerceu efeito positivo sobre a produção de xilanase, aumentando em 6% a atividade enzimática em relação ao padrão. Em um primeiro estudo de secagem,

o material fermentado seco na temperatura de 42°C por 20 horas foi o mais satisfatório. Em um segundo estudo de secagem, o tratamento com cloreto de cálcio, exerceu um efeito positivo na temperatura de 50°C para as duas cepas estudadas, *A. niger* LPB 3 e *A. niger* LPB 326; no entanto, um efeito contrário foi observado para a temperatura de 75-80°C, onde a presença de cloreto de cálcio praticamente não interferiu na atividade da xilanase. O extrato bruto enzimático foi caracterizado, em relação à temperatura e pH ótimos para atividade da xilanase produzida, e alguns estudos de estabilidade do produto líquido e após a secagem do material fermentado foram conduzidos em diferentes temperaturas. As atividades enzimáticas à 50°C mostraram ser maiores para todos os pH estudados (exceto pH 8,0), com pH ótimo na faixa de pH de 5,3 a 5,8. A xilanase estudada mostrou ser mais estável à 50°C com grandes perdas de atividade à 60°C; no entanto, a presença de xilana apresentou um efeito positivo aumentado a meia-vida da enzima. O  $Mg^{+2}$  modulou positivamente a atividade enzimática da xilanase. As constantes  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram  $3,79\text{ mg}^{-1}\text{mL}^{-1}$  e  $5,97\text{ }\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mg}$ , respectivamente. O congelamento da enzima com xilana extraída manteve 75% de atividade de xilanase após cinco dias. O tratamento com manitol 3% e leite em pó desnatado 1% foram úteis na manutenção da atividade enzimática durante a liofilização.

As características do extrato bruto enzimático contendo xilanase produzido neste trabalho o tornam viável para aplicações que não exijam pureza (devido à presença de outras enzimas, como a celulase) e que possam ser realizadas de acordo com os resultados obtidos nos estudos de estabilidade.

## 1. Introdução

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais. Um bioprocessos que vêm sendo muito aplicado para obtenção de vários metabólitos é a fermentação no estado sólido que oferece a possibilidade de se utilizar os mais diversos tipos de resíduos, os quais podem ser mais favoráveis ao crescimento de microrganismos pela similaridade com ambientes naturais, contribuindo, também, para a economia do processo. Além disso, a produtividade é geralmente maior que em outros processos.

Dentre os principais produtos representantes dos processos biotecnológicos figuram as enzimas, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade e controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. Investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de novas aplicações e de bioprocessos no setor industrial de produção de enzimas têm sido realizados recentemente. As enzimas estão sendo aplicadas nos mais diversos setores, sobretudo nas indústrias de alimentos, papel, têxtil, animal e farmacêutica, com um mercado em crescente expansão. As vantagens do uso de enzimas estão relacionadas ao alto grau de especificidade das reações, o que contribui com a eficiência do processo, e ao fato de serem produtos naturais biológicos podendo ter sua atividade regulada e ainda atuarem em concentrações baixas sob condições brandas de pH e temperatura.

Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as xilanases, destacando-se especialmente na indústria de polpa e papel, com expansão nas aplicações no setor de alimentos e em rações animais. São enzimas que degradam a xilana, a qual é o principal componente da hemicelulose

vegetal, podendo contribuir para o branqueamento de polpas de celulose reduzindo a utilização de produtos altamente poluentes, além de atuar na redução da viscosidade na digesta de animais com conseqüente aumento na absorção de nutrientes, clarificação de sucos e vinhos, liberação de xilooligosacarídeos que podem ser então convertidos em outros produtos de interesse, entre outras aplicações.

A produção das xilanases com características bioquímicas adequadas à aplicação industrial representam objeto de estudo relevante, cujo enfoque no desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias visando aumento de produtividade, de escala e redução de custos torna-se de extrema importância.

### 1.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolver um bioprocesso para obtenção de um concentrado rico em xilanases de origem fúngica em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos a partir de resíduos sólidos e de componentes coletados do ambiente e manter as cepas obtidas em meio de cultivo apropriado;
- Selecionar a melhor cepa, dentre àquelas obtidas do acervo do laboratório e todas as isoladas neste trabalho, que produza xilanases a partir dos resíduos estipulados, tornando o projeto economicamente atrativo;
- Analisar físico-quimicamente os subprodutos da agroindústria utilizados neste trabalho como substrato;
- Otimizar o processo de produção de xilanase em escala laboratorial com a cepa selecionada;
- Realizar um estudo de caracterização de algumas propriedades do extrato bruto enzimático rico em xilanases;
- Determinar as melhores condições de operação dos reatores de coluna de Raimbault em termos de nível de aeração e umidade inicial dos meios para obtenção de xilanases.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Mercado Mundial de Enzimas

Historicamente, a demanda por enzimas tem-se concentrado em mercados mais desenvolvidos devido ao alto valor agregado das enzimas, e aos recursos técnicos significativos necessários para a produção, desenvolvimento e aplicação das enzimas. No entanto, nota-se que existem mercados emergentes em países em desenvolvimento, que poderão apresentar as maiores taxas de crescimento (FREEDONIA, 2005).

Espera-se que a demanda mundial por enzimas atinja um crescimento de 6,5% até aproximadamente cinco bilhões e 100 milhões de dólares em 2009. Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologias de baixo custo energético, com baixo impacto ambiental e que utilizam matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria (FREEDONIA, 2005).

Enzimas específicas, incluindo enzimas para biocatálise, diagnóstico, farmacêutica e mercados de pesquisa e desenvolvimento, continuarão a se beneficiar dos avanços na biotecnologia que facilitam o desenvolvimento de novas aplicações, expandindo-se mais rapidamente que o mercado industrial. O mercado relacionado à aplicação de enzimas na alimentação animal apresenta uma tendência promissora de liderança pelos ganhos da indústria de enzimas (Fig. 2.1).

As enzimas industriais são grandes representantes dos processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos novos e no melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado (BCC, 2005). No entanto, o custo de uma enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo. Reduzir os custos de produção por otimizar o meio fermentativo e o processo é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (PARK et al., 2002).





FIGURA 2.1. Representantes e proporção de participação no mercado mundial de enzimas.

Os processos químicos estão sendo submetidos com uma maior frequência a exames minuciosos devido principalmente aos problemas relacionados a custos e ao meio ambiente, o que faz com que a biotecnologia avance ao oferecer inúmeras vantagens sobre as tecnologias convencionais (BCC, 2005).

Investimentos de todos os participantes em pesquisa e no desenvolvimento de aplicações serão fundamentais para um crescimento futuro significativo no setor (BCC, 2005).

## 2.2. Xilanases

Xilanases são glicosidades responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente, xilana), formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais específicas. A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo  $\beta$ -1,4 xilanase (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

### 2.2.1. Mecanismo de ação

As xilanases são classificadas em duas famílias principais (F ou 10 e G ou 11) das glicosil hidrolases. Ambas utilizam mecanismos catalíticos de par iônico e retêm a configuração anomérica durante a hidrólise. As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e produzem oligossacarídeos menores; as xilanases da família 11 são mais específicas para a xilana (JEFFRIES, 1996).

A endo  $\beta$ -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose (na cadeia principal de xilana) liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999). A degradação completa desta cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases ( $\beta$ -xilosidases ou  $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes. De acordo com BIELY (1985), para a hidrólise completa dos heteroxilo-oligômeros, são necessárias, ainda, enzimas que hidrolisem os grupos substituintes ácido glucupiranosídeo, arabinofuranosil e grupos acetil, como  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase, respectivamente. Portanto, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase) (FIGURA 2.2).

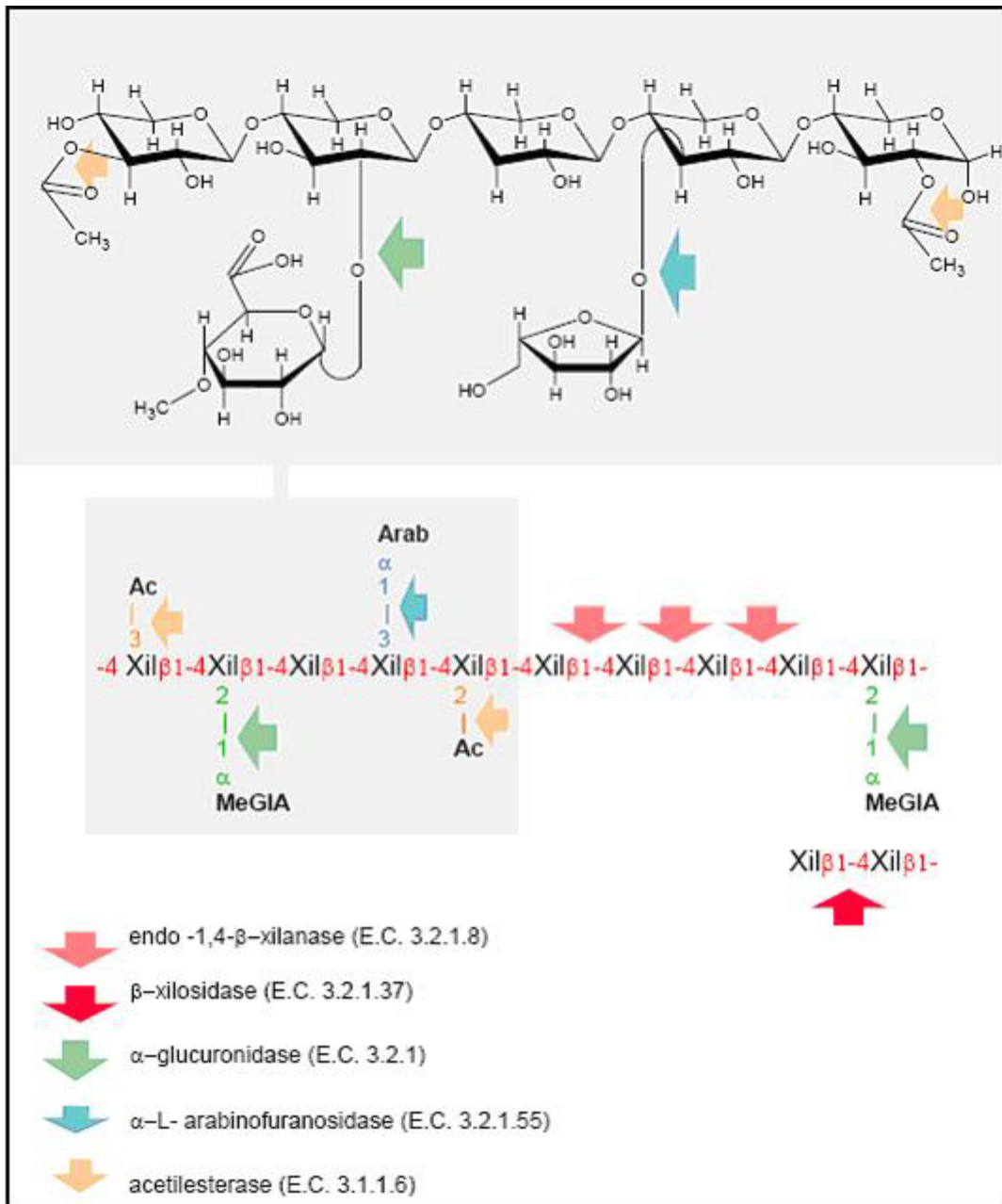


FIGURA 2. 2. Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac - grupo acetil; Arab - L-arabinofuranose; MeGIA - ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil - D-xilose. Fonte: BIELY, 1985.

A degradação da hemicelulose requer ainda a utilização de dois tipos de esterases, ferúlico esterase e cumárico esterase, para remoção dos resíduos de ácido ferúlico e ácido cumárico (KATO & NEVINS, 1985; SMITH et al., 1991; TENKANEN et al., 1992).

### 2.2.2. Endo-(1,4)- $\beta$ -xilanases

Endo-(1,4)- $\beta$ -xilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de xilanas. Apesar da predominância de xilana nas hemiceluloses, apenas cerca de 20-25% desta pode ser hidrolisada por xilanases. Limitações difusionais devido ao tamanho relativo dos poros podem ser um fator para explicar tal fato. Tem sido também sugerido que a distribuição heterogênea da hemicelulose pode limitar a acessibilidade da xilana à enzima. Outras razões possíveis incluem baixa suscetibilidade da xilana à hidrólise devido à sua natureza, instabilidade térmica da enzima e inibição pelo produto final (ONYSKO, 1993).

Em geral, os polímeros de xilana são clivados por xilanase apenas em regiões não substituídas para dar uma mistura de xilooligossacarídeos não substituídos e xilooligossacarídeos substituídos por cadeias curtas e longas.

A degradação completa da xilana prossegue com o auxílio de outras enzimas, que clivam as cadeias laterais fornecendo novo substrato para as xilanases. Um exemplo claro desta sinergia é o que ocorre entre endo-xilanase,  $\beta$ -xilosidase e arabinoxilana-arabinofuranohidrolase na hidrólise de arabinoxilanas (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

Em contraste com a maioria das endo-xilanases estudadas, algumas destas enzimas requerem a presença de substituintes e hidrolisam a cadeia principal apenas nas ligações vicinais a estes. Nestes casos suspeita-se que a cadeia lateral possa acomodar o centro ativo da enzima, orientando o substrato no sítio ativo de modo que as ligações apropriadas sejam clivadas na cadeia principal (NISHITANI & NEVINS, 1988).

As endo-xilanases podem ser classificadas de três modos:

#### 1) Quanto aos produtos formados

Segundo DEKKER & RICHARDS (1976) as endo-xilanases subdividem-se naquelas que não liberam arabinose de arabinoxilanase e nas que liberam arabinose deste substrato.

Outra forma de classificação foi sugerida por REILLY (1981), onde estas enzimas foram subdivididas em quatro grupos. Dois deles foram capazes de hidrolisar pontos de ramificação, mas com produtos finais distintos. Os outros dois grupos não foram capazes de hidrolisar ramificações. Num deles a enzima produziu xilooligossacarídeos maiores que xilobiose e no outro os principais produtos foram xilobiose e xilose.

## 2) Quanto à natureza do substrato

Esta classificação baseia-se na habilidade das endo-xilanases em degradar xilana solúvel ou insolúvel. Duas xilanases de *Trichoderma reesei* apresentaram maior atividade com xilana insolúvel (LAPPALAINEN, 1986; WONG & SADDLER, 1992). Outras duas xilanases de *Aspergillus niger* hidrolisaram preferencialmente xilana solúvel (FREDERICK et al, 1985).

Alguns exemplos relacionam a maior eficiência de hidrólise da xilanase ao tamanho do substrato, como no caso de *Aspergillus oryzae* que apresentou uma endo-xilanase com maior afinidade por substratos de cadeias maiores (GP>200) e outra com preferência por substrato com baixo grau de polimerização (GP 30-40) (BAILEY et al., 1991).

## 3) Quanto ao ponto isoelétrico e peso molecular

Essa classificação foi utilizada por WONG et al. (1988). Há dados na literatura que permitem algumas generalizações em relação à aplicação de endo-xilanase de alto e baixo peso molecular. Endo-xilanases de alto peso molecular apresentam maior eficiência catalítica com oligossacarídeos curtos. Para alguns casos, no entanto, as diferenças de peso molecular não são acompanhadas por diferenças nas propriedades catalíticas (YASUI et al., 1988).

Xilanases já foram purificadas de numerosos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Endo-xilanases de fungos têm pesos moleculares na faixa de 7 a 60 kDa e são geralmente mais ativas em pH entre 3,5 e 6,0 e temperatura de 40-60°C (TAN et al., 1987; BISWAS et al., 1990; BAILEY et al., 1991).

As endo-xilanases bacterianas apresentam pesos moleculares na faixa de 15 a 85 kDa, geralmente são mais ativas em meios levemente alcalinos ou neutros (pH 5,0-8,0) e em temperaturas mais elevadas (50-90°C) (UCHINO & NAJANE, 1981; ESTEBAN et al., 1983; NISHITANI & NEVINS, 1991; DAHLBERG et al, 1993, ZHENG, 2000).

A inibição de endo-xilanases por diferentes compostos químicos específicos fornece informações sobre seu sítio ativo e sobre o mecanismo de catálise. Os íons metálicos  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Ag^{+}$  podem inibir alguns tipos de xilanases. O íon mercúrio, por ser o inibidor mais eficaz, sugeriu a presença de grupos tiol no sítio ativo da enzima (BASTAWDE, 1992). Efeito contrário foi mostrado pelos íons cálcio, manganês e zinco para uma endo-xilanase clonada em *Streptomyces sp* (KLUEPFEL, et al., 1992).

Estudos com reagentes alquilantes como p-cloromercuribenzoato, N-bromosuccinamida, iodo e ácido iodoacético mostraram inibição da atividade enzimática, sugerindo que a enzima requer grupos -SH.

Ensaio realizados com xilanases de *Streptomyces*, *Bacillus* e *Chainia* (KESKAR et al., 1989; DESPHANDE et al., 1990), determinaram o envolvimento de resíduos de triptofano e cisteína nos sítios ativos. Foi demonstrado também que a adição de xilana juntamente com N-bromosuccinamida protege a xilanase de *Bacillus stearothermophilus* de inativação, indicando que o resíduo de triptofano estaria presente no sítio ativo da enzima, e não em outro sítio de ligação (KHASIN et al., 1993). O envolvimento de grupos carboxílicos no mecanismo de catálise de endoxilanases também foi comprovado nos estudos com *Schizophyllum commune* (BRAY & CLARKE, 1990) e *Streptomyces sp* (MARUI et al., 1993).

### 2.2.3. Produção de xilanases

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa (FSm) e fermentação no estado sólido (FES). Os processos de fermentação submersa são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classifica em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Atualmente, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas fazendo uso da FSm, geralmente utilizando-se microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por FSm é alto e o processo torna-se, muitas vezes, economicamente inviável (PANDEY et al., 2000a).

A produção comercial das xilanases se concentra principalmente nos fungos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.* Porém novas cepas estão sendo identificadas devido à demanda por cepas produtoras de xilanases com maior rendimento, alta estabilidade em condições extremas de temperatura e pH (KULKARNI et al, 1999). A produção por cepas fúngicas se mostra mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH, 1996).

A produção de enzimas, pelo cultivo em estado sólido é uma alternativa atraente, sob o ponto de vista econômico, como relatam os trabalhos de BAKRI et al., (2003) e PARK et al., (2002) para produção de xilanases. Em ambos os casos, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato, a obtenção das enzimas por FES apresentou significativa redução dos custos, o que foi atribuído, principalmente, ao baixo valor econômico do substrato utilizado.

GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY (1998), utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato, mostrando bons resultados, em termos de atividade de xilanase (2600 – 2800 U/g de matéria seca), em um cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*. Observou-se, ainda, neste trabalho, que a utilização de farelo de soja nos meios, como suplemento em termos de fonte de nitrogênio, favoreceu a produção de xilanase.

As ferramentas estatísticas são de grande valia para a otimização do processo de produção de enzimas. GHANEM et al. (2000) definiram as melhores condições para a produção de xilanase por *Aspergillus terreus* em cultivo em estado sólido, a partir de farelo de trigo, utilizando o planejamento experimental Plackett-Burman. Os autores observaram que a melhor produção da enzima ocorreu em pH 7,0 e temperatura de 50°C, nos frascos contendo 10 g de farelo de trigo, com umidade de 75%.

Uma vantagem adicional da produção de enzimas por FES é a possibilidade de se obter uma maior atividade enzimática por unidade de volume, o que favorece, consideravelmente, os processos de purificação, que representam um custo significativo na produção enzimática (SÁ-PEREIRA, 2003).

Além disto, geralmente as enzimas obtidas por FES possuem propriedades funcionais mais adequadas às aplicações industriais, muitas sendo mais estáveis à temperatura e pH (NIGAM & SINGH, 1994; KALOGERIS et al. (1998) e SOUZA et al. (1999). ZHENG & SHETT (2000), por exemplo, mostraram que a produção de pectinases por FES, a partir de resíduos das indústrias que processam frutas, levou a obtenção de enzimas com características de resistência a valores de pH ideais para aplicação industrial. Os autores ressaltam que, o pH naturalmente ácido dos substratos, levou a este resultado.

Segundo PANDEY (2003), a exata razão para o aumento dos níveis de atividade enzimática nos cultivos em meio sólido não é totalmente conhecida, mas o fato de que este cultivo aproxima-se muito do ambiente natural de crescimento dos microrganismos explica, em parte, as diferenças constatadas.

#### 2.2.4. Fatores que influenciam a produção de xilanases

A produção de xilanases por FES vem sendo investigada visando avaliar o efeito de diversos fatores sobre a produção enzimática, bem como buscar estratégias para a otimização da produção. A escolha do melhor substrato indutor de xilanase e do microrganismo, o efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção da enzima, os efeitos da  $a_w$  e umidade do meio, pH e temperatura do cultivo e a influência da aeração nos sistemas são as principais variáveis que influenciam na produção de xilanase por FES (HALTRICH et al., 1996).



#### 2.2.4.1. Xilanases fúngicas

A degradação de um material hemicelulolítico pelos fungos ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes dos materiais lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são suscetíveis ao transporte pela membrana celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos (FERRAZ, 2003). As xilanases já foram encontradas e purificadas a partir de vários fungos filamentosos, podendo-se citar os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Talaromyces*, entre outros (KHENG, 2005; PANDEY, 1999). Diferentes espécies de *Aspergillus* foram descritas como produtoras, tais como *A. awamori*, *A. fischeri*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. tamarii* e *A. terreus* (REIS, 2003; HALTRICH, 1996).

As xilanases excretadas pelos microrganismos podem ser constitutivas ou indutivas. Elas são constitutivas quando são sintetizadas pelos microrganismos independente da necessidade, em velocidade constante. São ditas indutivas quando ocorrem inicialmente em pequenas quantidades e aumentam sua concentração na presença de um determinado substrato.

As xilanases podem diferir em ocorrência e concentração dependendo das condições metabólicas da célula. Geralmente são enzimas indutivas, que podem ter sua síntese associada a mudanças nutricionais e favorecidas pelas condições de cultivo, pH e temperatura (ANGELO, 1995).

##### 2.2.4.1.1. Oxigenação

Pesquisas recentes mostraram que a produção de xilanases é um processo dependente de oxigênio, tanto na fase de crescimento do microrganismo quanto durante o acúmulo da enzima. É importante que o oxigênio seja mantido em um nível que seja suficiente para evitar limitações ou diminuição da respiração normal dos microrganismos (GUSEK *et al.*, 1991).

A demanda de oxigênio pode variar de microrganismo para microrganismo e depender muito das condições utilizadas no processo. Foi demonstrado existir muitas relações entre variáveis mecânicas (agitação, transferência de oxigênio),

propriedades do meio e parâmetros específicos do fungo (velocidade de crescimento, morfologia) (MITARD & RIBA, 1988; HOG *et al.*, 1994). Deste modo, estudos respirométricos são importantes para se determinar a relação entre a quantidade de oxigênio necessária durante o crescimento de determinado microrganismo e para a produção das xilanases.

#### 2.2.4.1.2. pH e temperatura

As xilanases apresentam características diferentes, como pH e temperatura ótimos de atuação, e especificidade pelo substrato, dependendo do microrganismo produtor (HALTRICH *et al.*, 1996). A faixa ótima de temperatura para produção de endo-xilanases, por bactérias ou fungos, varia de 30 a 60 °C, sendo as bactérias mais conhecidas por produzirem xilanases termoestáveis (KULKARNI *et al.*, 1999).

De uma maneira geral, as xilanases, provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo, no entanto, a melhor produção enzimática obtida em pH entre 4 e 7. Geralmente, os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo.

#### 2.2.4.1.3. Composição do meio

Um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanases, por microrganismos, refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, pois, a partir daí, pode-se definir as características da enzima, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis, como a produção de celulases, quando a enzima produzida destina-se a indústria de celulose papel, por exemplo. Neste caso, o substrato não é somente a fonte de carbono e energia, mas fornece, também, os compostos indutores da produção enzimática para o microrganismo (KULKARNI *et al.*, 1999).

O uso de diferentes substratos foi relatado por diversos autores. WIACEK-ZYCHLINSKA *et al.* (1994) comparou a produção de xilanase por *C. globosum* e *A. niger* em quatro tipos diferentes de substratos.

SOUZA *et al.* (2001) verificaram o efeito de vários açúcares facilmente metabolizáveis como glicose, xilose, frutose, maltose, celobiose e lactose, na

indução de xilanase por *Aspergillus tamaritii*. Observou-se que a adição de 1% destes açúcares nos meios de cultivo constituídos por materiais lignocelulósicos como base de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, causou uma severa repressão catabólica no sistema. No entanto, verificou-se que os cultivos conduzidos em meios à base de farelo de trigo foram resistentes à presença dos açúcares, não se detectando efeitos de repressão catabólica com a adição de, até, 10% de glicose.

#### 2.2.4.1.4. Umidade e $a_w$

A melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas, nos materiais, refere-se à determinação de sua atividade ( $a_w$ ), ou seja, do teor de água livre. A água pode ocorrer como água ligada e água livre, resultando em conteúdo total de água (umidade). Ao apresentar-se intimamente ligada às moléculas constituintes de um material, a água não pode ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação, onde o metabolismo dos microorganismos é paralisado, não havendo desenvolvimento ou reprodução; ou pode encontrar-se livre, estando disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas. O valor de  $a_w$  (atividade de água) indica o nível de água em sua forma livre nos materiais, considerando-se 0 para materiais livres de água e 1 para a água em sua forma líquida (LAMIC, 2006).

Com relação à influência de  $a_w$  sobre a produção de enzimas, GRAJEK e GERVAIS (1987), constataram que, na produção de xilanase por *Trichoderma viride*, em cultivo em estado sólido, a atividade máxima foi obtida em  $a_w$  de 0,995, enquanto para a produção de outras enzimas, como  $\beta$ -glucosidase o melhor valor de  $a_w$  foi de 0,96 – 0,98.

Mais recentemente, LU et al. (2003) concluíram que a produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus* por FES, em escala piloto, utilizando koji (massa de arroz cozido fermentado) seco como meio, foi fortemente afetada pela atividade de água do meio. A melhor umidade do meio, para se atingir a produtividade enzimática máxima foi de 40-50%, o que, de acordo com os autores, corresponde a valores de  $a_w$  na faixa de 0,93 a 0,96.

O controle da biosíntese de enzimas em cultivos no estado sólido parece estar relacionado, dentre outros fatores, com a umidade do substrato. Em função

desta importância significativa da umidade dos substratos sólidos, estudos vêm sendo realizados para verificar o efeito e o valor ótimo da umidade inicial do substrato para o crescimento celular e a produção de metabólitos (BISWAS et al., 1988).

Alguns autores observaram que as atividades enzimáticas específicas diminuiriam nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto, foi favorável ao crescimento microbiano. Desta forma, sugerem que em processos com resultados semelhantes, é possível aumentar a atividade enzimática, desde que a umidade seja controlada em níveis altos, na fase de crescimento, para favorecer o microrganismo, e, na fase estacionária, seja levada a um nível mais baixo, adequado para a produção enzimática (NARAHARA et al., 1982; KIM et al., 1985).

GAWANDE & KAMAT (1999) estudaram os efeitos do nível de umidade do meio bem como do tipo de agente umidificador, na produção de xilanase por espécies de *Aspergillus* em FES, e concluíram que, variando-se a relação peso/volume entre farelo de trigo e agente umidificador de 1:1 até 1:7, o melhor resultado de atividade enzimática foi obtido no cultivo em meio com a relação de farelo/umidade de 1:5, independentemente da espécie utilizada.

#### 2.2.5. Aplicações

Todo interesse no estudo dos sistemas de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos, por isso estudos de termoestabilidade e pH ótimo destas enzimas são propriedades de importância particular.

A aplicação das xilanase divide-se em duas categorias, segundo BIELY (1985): uma associada a polissacaridases (por exemplo, celulasas) e outra livre de celulase. Como exemplo da primeira, tem-se o uso de xilanases juntamente com outras enzimas na indústria alimentícia (BIELY, 1985), visando clarificação de sucos e vinhos, fabricação de pães e na etapa da filtração da cerveja rompendo sólido em suspensão (VAN DER BROECK et al, 1990). No processamento de sucos, frutas e vegetais, a ação combinada das xilanases, celulasas, pectinases e outras hemicelulasas apresentam um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do

produto final. A liquefação das polpas para a fabricação de sucos, por exemplo, após a extração, que pode ser realizada por maceração enzimática, é uma operação possível de ser efetuada, enzimaticamente, por uma combinação de xilanases, pectinases e celulases (WONG et al., 1988; DA SILVA et al., 1997).

Xilanases também são utilizadas, em aplicação conjunta com outras polissacaridases, nas vinícolas e cervejarias, para reduzir a concentração de  $\beta$ -glicanas, que aumentam à viscosidade dos mostos, prejudicando, conseqüentemente, a etapa da filtração e dificultando a clarificação dos vinhos. Além disto, a estabilidade coloidal da cerveja, no resfriamento, também sofre ação da presença das  $\beta$ -glicanas, uma vez que estas são insolúveis em certas concentrações de álcool, podendo ser precipitadas (WOODWARD, 1984 ; DA SILVA et al., 1997 ; KULKARNI et al., 1999).

Na indústria de panificação as xilanases vêm sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam de 2 a 3% (p/p) da farinha de trigo. Estes compostos absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim, o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases (arabinosidases) à farinha leva à liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume e melhor estrutura de miolo (KULKARNI et al., 1999).

Xilanase adicionada à ração de aves e suínos aumentou sua digestibilidade (BRICE & MORRISON, 1991). O aumento na digestibilidade de rações animais é um processo que pode ser obtido pela aplicação das xilanases, conjuntamente com outras hemicelulases, uma vez que a hemicelulose é uma fibra insolúvel, e a sua ingestão, na forma integral, possui pouco valor nutricional para os animais ruminantes (KULKARNI et al., 1999). Um recente trabalho realizado por NSEREKO et al. (2000) mostrou a eficiência de várias enzimas na hidrólise e degradação da fibra de alfafa, utilizada para alimentação animal, tendo sido verificado que endo- $\beta$ -1,4 xilanase e acetilesterase foram as enzimas mais relevantes para o processo.

A aplicação de xilanases, diretamente sobre a estrutura da xilana, leva à remoção seletiva da hemicelulose e também à obtenção de produtos como xilose e xilo-oligômeros, que apresentam potencialidade de aplicação direta como padrões para cromatografia ou na indústria de alimentos, como espessantes,

substituintes de gordura e aditivos anti-congelantes. Além disto, estes compostos podem, ainda, ser convertidos, química ou biologicamente, em combustíveis líquidos, solventes e edulcorantes de baixas calorias (como por exemplo, o xilitol). Têm-se, ainda, relatos da aplicação de xilanases na extração de café, de amido, de flavorizantes, de pigmentos e de óleos (WOODWARD, 1984; WONG, et al., 1988; KULKARNI et al., 1999).

Na segunda categoria vemos a aplicação de xilanases nas indústrias têxtil (desengomagem de fibras naturais) e de celulose e papel.

Uma das maiores aplicações da xilanase, livre de celulase, está relacionada às indústrias de celulose e papel. Nesta aplicação, as xilanases podem auxiliar, consideravelmente, na redução da poluição ambiental, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que resulta na formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente. Em função dos efeitos biológicos diretos em ecossistemas aquáticos de efluentes de branqueamento à base de cloro, existem, hoje, especialmente na América do Norte e Europa Ocidental, sérias restrições ao uso dos compostos clorados nos processos de branqueamento (KULKARNI et al., 1999). A utilização da xilanase, no biobranqueamento das polpas, leva à diminuição do consumo de branqueadores químicos, sem comprometer, entretanto, o resultado final, em termos da alvura do papel (DA SILVA et al., 1997). No entanto, deve-se ressaltar que, para maior eficiência desta aplicação específica das xilanases, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes a alcalinidade e a alta temperatura, e totalmente livre de celulasas (KULKARNI et al., 1999).

### 2.3. Fermentação no estado sólido

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, no entanto, o substrato deve conter umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida (PANDEY, 1992; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Outros autores a descrevem como sendo o crescimento e o metabolismo de organismos em materiais sólidos como uma estrutura organizada na ausência

total de líquido na forma livre (RAIMBAULT E ALAZARD, 1980; CANNEL E MOO-YOUNG, 1980).

A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução. Os níveis de umidade relativa variam de acordo com os autores e possuem uma estreita relação com o tipo de substrato ou suporte utilizado e o nível máximo de retenção de água proporcionado por essas matérias primas (LONSANE, 1985).

### 2.3.1. Tipos de FES

Em função da natureza do suporte, pode-se distinguir dois tipos de FES (BARRIOS-GONZÁLEZ, 1996):

- cultura sólida em uma fase substrato-suporte, onde a fase sólida é constituída por um material que possui função de suporte e fonte de nutrientes, e
- cultura sólida com uma fase suporte impregnada de um meio líquido. Neste tipo de fermentação, a fase sólida é considerada como um suporte inerte, que não constitui uma fonte de nutrientes para os microrganismos, mas serve de reservatório para uma solução nutritiva que estará adsorvida na matriz sólida.

### 2.3.2. Fermentação no estado sólido x Fermentação submersa

O uso da fermentação no estado sólido geralmente leva a uma comparação com a fermentação submersa (FSm), para uma melhor compreensão do processo, e é citada por diversos autores (MUDGETT, 1986; HESSELTINE, 1987; LONSANE et al., 1985). GERVAIS & MOLIN (2003) relatam que a principal diferença entre a FSm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As fermentações submersas são consideradas reações de mistura perfeita, onde, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos e os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto. RAMANA MURTHY et al. (1993) descrevem que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se a utilização, na FES, do

substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FSm, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido.

A FES é considerada mais natural que outros tipos de fermentações, como, por exemplo, a fermentação submersa (FSm), uma vez que seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza (HESSELTINE, 1987).

As principais vantagens e desvantagens da FES estão relacionadas na Tabela 2.1.

TABELA 2.1. Aspectos positivos e negativos da FES

VANTAGENS	DESVANTAGENS
O meio de cultivo é simples, na maioria das vezes, natural. Condições próximas dos meios naturais.	Pré-tratamento dos suportes pode ser necessário em alguns casos, podendo modificar negativamente a estrutura do substrato.
Efluentes líquidos reduzidos	Difícil regulação dos parâmetros de cultura (pH, umidade,...)
Diminuição das contaminações devido a baixa umidade e $a_w$	Risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade nas fermentações mais longas).
Em fermentações tradicionais, a microflora do suporte serve como inóculo.	Alta taxa de inoculação quando não se utiliza a microflora natural. A estimativa precisa da biomassa produzida é difícil.
Fácil aeração devido a porosidade do material. Baixa demanda de energia.	Difícil automação do processo.
Possibilidade de utilização direta dos sólidos fermentados.	Em alguns casos a secagem destes materiais, se necessária, pode danificar ou inativar (enzimas) os metabólitos produzidos.
Volume do fermentador menor que o da cultura líquida; produtividade maior. Extração facilitada pela alta concentração de produtos.	Os extratos podem estar contaminados com componentes indesejáveis do substrato.

Fonte: Raimbault, 1998.

O cultivo no estado sólido oferece vantagens sobre o cultivo líquido, especialmente para culturas fúngicas. Devido à natureza dos substratos, a



aeração tende a requerer pressões menores que as necessárias para os cultivos líquidos, e a agitação vigorosa é dispensável, o que pode evitar em grande parte a ruptura celular. Os metabólitos obtidos são geralmente mais concentrados e os procedimentos de purificação são mais baratos (PANDEY et al., 1992; HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

### 2.3.3. Aplicações da FES

A utilização da FES não é recente. Desde o início da história o homem tem feito uso de microrganismos para seu benefício, mesmo não compreendendo os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações. Dentro deste contexto, os processos de FES, representam um importante papel, pois sabe-se que várias formas de alimentos, utilizando esse cultivo microbiano, fazem parte da dieta dos povos dos países Orientais, Asiáticos e Africanos há muitos séculos (NIGAM & SINGH, 1994 ; DEL BIANCHI et al., 2001; PANDEY et al., 2000a).

Os processos de fermentação no estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola (PANDEY et al., 1992). Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (CASTILHO et al., 2000).

Devido a grande utilização deste processo em diversos setores (TABELA 2.2), a necessidade de desenvolvimento de novos processos em FES e otimização dos processos existentes torna-se de interesse econômico, levando-se ainda em consideração as vantagens que este tipo de fermentação oferece em diversos segmentos.

TABELA 2.2. Aplicações da FES em diferentes setores econômicos

SETOR	APLICAÇÃO	EXEMPLOS
Indústria agro-alimentar	Fermentações de alimentos	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos fermentados
	Produção de Cogumelos	<i>Agaricus, Pleurotus, Shiitaki</i>
	Bioconversão de resíduos	Compostagem, detoxificação, ensilagem
Agricultura	Aditivos alimentares	Aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
	Biocontrole, bioinseticidas	<i>Beauveria, Metarrhizium, Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas	Giberilinas, <i>Rhizobium, Trichoderma</i>
	Micorrização	Inóculo de plantas
Fermentação industrial	Enzimas	Amilases, celulases, pectinases, proteases, xilanases
	Antibióticos	Penicilina, probióticos
	Ácidos Orgânicos	Ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Etanol	<i>Schwanniomyces</i> sp.
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides

FONTE: RAIMBAULT, 1998.

A Tabela 2.3 mostra alguns exemplos de aplicações recentes da FES, com os mais variados substratos e microrganismos, incluindo processos desenvolvidos anteriormente no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

TABELA 2.3. Aplicações recentes da Fermentação no Estado Sólido.

Produtos	Substrato/Suporte	Microrganismo	Referência
Amilases	Bagaço de mandioca	<i>Rhizopus</i> sp.	SOCCOL et al., 1994*
L-Asparaginase	Bagaço de Cana Soja	<i>Aspergillus niger</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPIER, 2006* ABDEL-FATTAH & OLAMA, 2002
Glicoamilase e xilanase	Bagaço de mandioca	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	DALSENTER, 2000
Fungo entomopatogênico	Bagaço de cana	<i>Beauveria bassiana</i>	DALLA SANTA, 2005*
Aromas naturais	Resíduos do café	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	MEDEIROS, 2003*
Poligalacturonase, celulase, xilanase e protease	Farelo de trigo e Casca de Manga	<i>Aspergillus niger</i>	COURI et al., 2000
Xilanase	Bagaço de cana de açúcar	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	SOUZA et al., 1999
Penicilina	Bagaço de cana de açúcar	<i>Penicillium chrysogenum</i>	DOMINGUEZ et al., 2000
Quitosana	Batata doce	<i>Gongronella butleri</i>	NWE et al., 2002
Lacase e Mn-Peroxidase	Sabugo de milho e resíduo da extração de óleo de oliva	<i>Panus tigrinus</i>	FENICE et al., 2003
Ácido cítrico	Bagaço de mandioca e bagaço de cana de açúcar	<i>Aspergillus niger</i>	VANDENBERGHE et al., 2000*
Enriquecimento nutricional de ração animal	Palha de milho	<i>Penicillium decumbens</i>	YANG et al., 2001

\* Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR.

Segundo SOCCOL (2001) e SOCCOL & VANDENBERGHE (2003), os novos campos de aplicação da FES de acordo com suas potencialidades podem resumir-se em:

- 1) a utilização de FES para a produção de metabólitos fúngicos que habitualmente são produzidos por meio líquido;
- 2) a possibilidade de obtenção de metabólitos que dependem da diferenciação celular do micélio a qual normalmente está suprimida ou restrita na fermentação em meio líquido;
- 3) a transferência das aplicações sócio-econômicas da FES aos países industrializados, permitindo a colaboração e intercâmbio entre regiões pobres e desenvolvidas;
- 4) aplicação dos processos tradicionais no enriquecimento protéico de alimentos especialmente produtos agroindustriais com alto teor de amido ou celulose;
- 5) biodegradação de compostos orgânicos tóxicos do solo como pesticidas e herbicidas por meio de microrganismos que requeiram grandes quantidades de inóculo;
- 6) aproveitamento de diferentes resíduos agrícolas e agroindustriais para obtenção de produtos de alto valor comercial como hormônios vegetais, bioinseticidas, pigmentos naturais, enzimas e ácidos orgânicos.

#### 2.3.4. Fatores que afetam a FES

##### 2.3.4.1. Atividade de água e umidade

Na FES, a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da fase sólida, sendo que esta quantidade deve ser suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos sem destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato ou do suporte (GERVAIS et al., 2003). A água desempenha diversas funções nos processos de FES: influencia na constituição do microrganismo, serve de veículo de enzimas, nutrientes e metabólitos e intervém na solubilização do gás oxigênio (ORIOLE et al., 1988).

Uma umidade elevada do substrato provoca uma diminuição da porosidade da matriz sólida, uma fraca difusão de oxigênio e aumenta o risco de

contaminações bacterianas. Por outro lado, uma baixa umidade leva a um crescimento limitado e diminui a acessibilidade do substrato. Durante a FES, ocorrem mudanças na  $a_w$ , devido à perda de umidade do meio com o calor e liberação de água do metabolismo microbiano (LONSANE et al., 1985).

Geralmente, as bactérias se desenvolvem em atividades de água elevadas entre 0,85 e 0,99, as leveduras crescem melhor em 0,75 a 0,9 e os fungos entre 0,6 e 0,9. A umidade varia entre os microrganismos empregados, produtos a serem produzidos e tipo de substrato utilizado. Portanto, em geral os tipos de microrganismos que podem se desenvolver em sistemas de FES são determinados pelo fator atividade de água (RAIMBAULT, 1998).

#### 2.3.4.2. Temperatura

A liberação de calor produzida durante as atividades metabólicas dos microrganismos, provoca uma elevação significativa da temperatura no decorrer das fermentações (HESSELTINE, 1987). A heterogeneidade do material sólido promove a formação de gradientes de temperatura devido à forte atividade microbiana. Embora a FES seja uma alternativa para a maioria dos processos convencionais de fermentação líquida, o controle de temperatura, em grande escala, nas fermentações em estado sólido, é um difícil problema a ser resolvido (HASAN et al., 1998). Altas temperaturas, decorrentes da atividade metabólica dos microrganismos, especialmente com a respiração, durante o crescimento, afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas (HASAN et al., 1998).

Uma baixa atividade de água, ausência de agitação e baixa condutividade térmica de materiais biológicos são prejudiciais ao desenvolvimento de microrganismos pelo aumento de temperatura nos reatores (MOO-YOUNG et al., 1983).

#### 2.3.4.3. pH

O controle e monitoramento deste parâmetro, durante as fermentações no estado sólido, não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003). De acordo com MUDGETT (1986), a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH.

O pH inicial de um cultivo é ajustado ao ótimo pela adição de uma solução (mineral, tampão, ácido-básica) que impregna o substrato, mas a determinação exata do pH só poderá ser efetuada novamente no final do processo de FES. Em alguns casos o pH do próprio substrato pode ser ideal para o cultivo, sem necessidade de ajuste.

O valor de pH tende a variar em resposta às atividades metabólicas dos microrganismos, seja através da produção de ácidos durante a fermentação ou mesmo do consumo destes e a formação de compostos como uréia, que tendem a elevar o pH (BRAND, 2000).

#### 2.3.4.4. Aeração

O controle do ambiente gasoso na FES aeróbica é um fator importante para o desenvolvimento dos microrganismos, que depende da velocidade do fluxo de oxigênio pelo substrato e da rapidez de consumo de  $O_2$  pelos microrganismos (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980). A aeração desempenha diferentes funções: provisão de  $O_2$  para o crescimento aeróbio e metabolismo; regulação da umidade; regulação da temperatura; eliminação de vapor d'água,  $CO_2$  e alguns metabólitos voláteis.

O nível de  $O_2$  necessário para a FES é esperado ser menor do que na FSm. No entanto, de acordo com LONSANE et al. (1991), o problema com a difusão de  $O_2$  na FES, resume-se à transferência do gás entre as partículas. Uma situação ideal para o crescimento seria a capacidade de um microrganismo de conseguir  $O_2$  diretamente da atmosfera gasosa (RAMANA MURTHY et al. (1993)). No entanto, qualquer que seja a forma de transporte de  $O_2$ , observa-se que a velocidade de transferência na FES é maior que na FSm (LONSANE et al., 1991).

O ambiente gasoso pode afetar significativamente os níveis de produção de biomassa e enzimas; algumas linhagens podem se desenvolver melhor em taxas de aeração mais elevadas, mas a produção de alguns metabólitos pode ser reduzida, e vice-versa. O tipo de frasco, abertura e tipo de tampão a ser utilizado deve ser levado em consideração em fermentações de bancada, e se possível testado experimentalmente, podendo influenciar positiva ou negativamente na obtenção do produto desejado.

#### 2.3.4.5. Microrganismos

Vários grupos de microrganismos podem crescer em substratos sólidos, porém os fungos filamentosos são os utilizados na maioria dos casos, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL, 1994).

O modo de crescimento dos fungos, sua boa tolerância a baixas  $a_w$  e altas pressões osmóticas os fazem eficientes e competitivos com a microflora natural para bioconversão de substratos sólidos. O crescimento dos fungos filamentosos, que é uma combinação da extensão apical das hifas associado à geração de novas hifas por ramificação do micélio, permite ao fungo penetrar no substrato sólido e formar uma estrutura sólida, o que confere uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, as enzimas hidrolíticas são excretadas nas hifas sem grande diluição como ocorre na FSm, o que faz com que sua ação seja muito mais eficiente, permitindo adentrar no substrato aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas (RAIMBAULT, 1998).

A avaliação do crescimento fúngico por determinação da biomassa formada em FES é muito difícil devido aos problemas de separação entre a biomassa microbiana e o substrato. Diversos métodos diretos (recuperação da biomassa por crescimento em filtros de membranas; observações por microscópio eletrônico; equação estequiométrica global) e indiretos têm sido citados para dosagem de biomassa, sendo os métodos indiretos os mais utilizados nas FES e se baseiam na medida de alguma atividade metabólica ou de algum componente específico da biomassa (LEKHA & LONSANE, 1994). É importante ressaltar que, para representar o crescimento da biomassa, o indicador selecionado deve ser

constante durante o crescimento do microrganismo e sob diferentes condições de cultivo (SCOTTI et al., 2001).

Os métodos indiretos para determinação de biomassa em FES podem ser classificados da seguinte forma (DEGRANGES et al. (1991)):

a) baseados nos constituintes celulares como: ergosterol (OOIJKAAS et al., 1998; SANTOS, 2001; CARVALHO, 2004), glicosamina (KALOGERIS et al., 1998; SCOTTI et al., 2001; GELMI et al., 2002), ácidos nucléicos (OOIJKAAS et al., 1998) e proteína (CORDOVA-LOPEZ et al., 1996, CÓRDOVA-AGUILAR et al., 2001; FENICE et al., 2003);

b) baseados na atividade biológica: como ATP (SMITS et al., 1996) e consumo de oxigênio e/ou produção de CO<sub>2</sub> (SUGAMA & OKAZAKI, 1979; SATO et al., 1983; RODRIGUEZ LEON et al., 1988; SOCCOL, et al., 1994; VANDENBERGHE, 2000).

c) baseados no consumo de algum componente do meio (nutrientes) (LU et al., 1995; LU et al., 1998).

#### 2.4. Substrato e suporte

A seleção do substrato adequado para FES depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso (PANDEY et al., 2000a).

A biomassa, na sua forma natural ou em resíduos da agricultura e resíduos florestais ou desperdício das devastações, é gerada em muitas toneladas anualmente, o que pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo na natureza (PANDEY et al., 2000 a). Além disso, a falta de aplicação prática deixa de agregar valor a estes resíduos, que poderiam gerar lucros para os mais diversos setores (visto a possível utilização em FES).

Desde que esta biomassa é constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose, existem inúmeras possibilidades de aproveitamento destes resíduos. Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes importantes para o processo encontram-se em concentrações muito baixas, sendo necessária a suplementação do meio (NIGAM & SINGH, 1994 ; PANDEY et al., 2000a). Em alguns casos, os substratos, principalmente os de origem lignocelulósica, podem ser submetidos a pré-



tratamentos (químicos ou mecânicos) para serem mais facilmente acessados pelos microrganismos (PANDEY et al., 2000a).

A composição dos meios de cultivo para a produção de xilanases por diferentes microrganismos inclui, algumas vezes, além do substrato indutor, diversos sais minerais e alguns íons metálicos. No entanto, muito frequentemente, é necessário acrescentar, aos meios, uma fonte de nitrogênio.

Embora muitos fatores relacionados aos substratos para FES tenham importância para o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse, o tamanho da partícula e o nível de umidade e/ou a atividade de água do meio são considerados os mais críticos (PANDEY et al., 2000a; PANDEY, 2003). Frequentemente, partículas pequenas possuem uma maior área superficial para a utilização, pelo microrganismo, sendo uma propriedade desejável para as fermentações sólidas. No entanto, partículas muito pequenas podem resultar em compactação do substrato, o que, conseqüentemente, interfere na aeração do sistema, bem como na utilização do oxigênio pelos microrganismos. Por outro lado, a utilização de partículas de tamanho maior leva a um aumento do espaço interpartículas, melhorando os processos relacionados à transferência do oxigênio, mas limitando a área superficial das partículas, onde ocorrem os processos de transferência de massa (nutrientes e umidade), vitais para o microrganismo (PANDEY et al., 2000a).

#### 2.4.1. Hemicelulose

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (FIGURA 2.3).

Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido D-galacturônico, ácido glucurônico e seus derivados (JANES, 1969). A grande maioria das hemiceluloses apresenta ligações  $\beta$  (1,4) entre os seus componentes, exceto as que possuem galactose, cuja ligação é do tipo  $\beta$  (1,3) (MAGEE & KOSARIC, 1985).

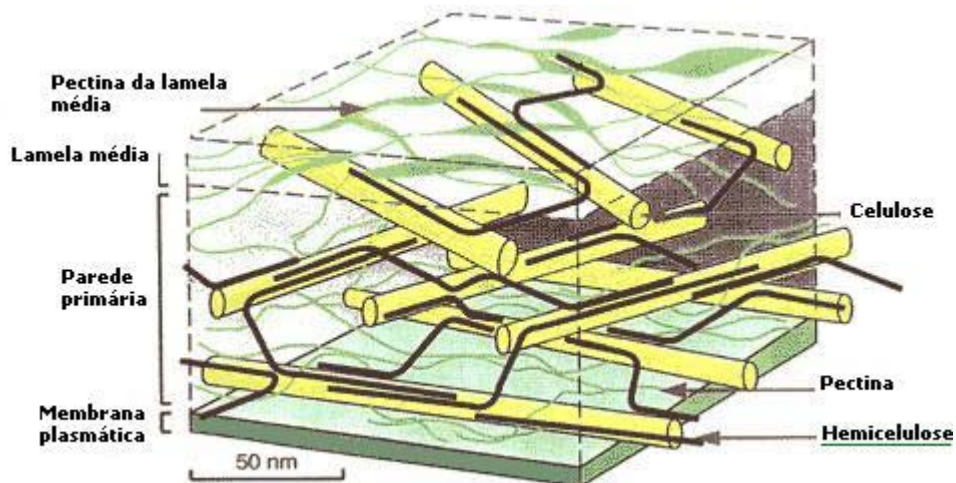


FIGURA 2.3. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal, incluindo a hemicelulose. Fonte: DARLING, 2006.

Hemiceluloses que possuem predominância de um dos açúcares que a compõem (na cadeia principal e na ramificação lateral) também são chamadas genericamente de xilanas (xilose), mananas (manose), galactosanas (galactose), etc., (BIELY, 1985 ; DA SILVA et alii, 1997). Cerca de 40% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais refere-se à hemicelulose sendo, portanto, depois da celulose, o carboidrato mais abundante na natureza (WOODWARD, 1984; DA SILVA et alii, 1997).

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolíssacarídeo composto de ligações  $\beta$ -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra. No caso de madeiras duras nas quais a xilana corresponde de 20 a 35% do peso seco da biomassa, o grupo substituinte predominante é O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana com substituições principalmente no C2 através de ligações  $\alpha$ -1,2 do ácido 4-O-metil glucurônico (10 a 35%) e 70% dos C2 e C3 acetilados (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993). Em madeiras moles o principal componente é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana, sendo que essa hemiceluloses contém maiores proporções de manose e galactose. Neste caso, a fração de xilana corresponde, em média, a 8% do peso seco da biomassa. Resíduos de ácido ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L-arabinose (WONG et al., 1988 ; HALTRICH et al., 1996).

A utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção de xilanases, o que vem sendo feito, frequentemente, em pequena escala (HALTRICH et al., 1996). Entretanto, para a produção em escalas maiores, a utilização destes materiais, de elevado custo, torna o processo inviável, economicamente. Para solucionar esta questão, a utilização de resíduos agroindustriais e de exploração florestal como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar (PALMA et al., 1996 ; SOUZA et al., 1999), sabugo de milho (DAMASO et al., 2000 ; BAKIR et al., 2001) e farelo de trigo (GOMES et al., 1994 ; RIDDER et al., 1999 ; BAKIR et al., 2001), dentre outros, tem sido a solução mais empregada.

Estes resíduos são fontes de xilana e xilo-oligômeros, podendo ser utilizados, na forma natural, como é o caso dos processos em estado sólido, ou após pré-tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para sua utilização nos cultivos submersos e, em alguns casos, também nos cultivos em estado sólido (KULKARNI et al., 1999).

#### 2.4.2. Bagaço de cana

O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) do mundo, seguido por Índia e Austrália. A produção brasileira de cana no período de 2005/2006 superou a marca de 387 milhões de toneladas, volume processado em 306 usinas (ÚNICA, 2006).

Uma área equivalente a aproximadamente 5 milhões de hectares é utilizada para o plantio, num ramo que movimenta 6% do PIB. Planta-se cana no Centro-Sul e no Norte-Nordeste do Brasil, o que permite dois períodos de safra por ano (ÚNICA, 2006).

A cana-de-açúcar é largamente utilizada em usinas e destilarias que processam a sua biomassa produzindo açúcar como alimento, álcool hidratado para movimentar veículos (na média, 55% da cana brasileira vira álcool e 45%, açúcar) e álcool anidro para melhorar o desempenho energético e ambiental da gasolina, obtendo como subproduto o bagaço de cana.

O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira. Estima-se que, a cada ano, sobrem de 12 a 15 milhões de toneladas deste material (REZENDE et al., 2002), um valor que só tende a aumentar com o

avanço da produção de cana de açúcar. As próprias usinas utilizam de 60% a 90% deste bagaço como fonte energética (substitui o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras) e para a geração de energia elétrica. O bagaço como combustível veio substituir a lenha, que era a fonte energética usada há alguns anos na evaporação do caldo (FAPESP, 1998).

A geração de energia elétrica vinda da queima do bagaço nas caldeiras (Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica, criado através da Lei 10.438, de 26 de abril de 2002), vem estimulando os investimentos das usinas sucroalcooleiras no processo de co-geração. Contudo, a co-geração a partir do bagaço da cana tem um custo que varia entre US\$ 600 e US\$ 1200 por quilowatt, dependendo da potência das turbinas. Portanto, para gerar 4 mil MW seria necessário um investimento de US\$ 4 bilhões, o que dificulta a implementação deste processo em algumas indústrias (COM CIÊNCIA, 2001).

Mesmo com o emprego da co-geração, em muitas usinas o bagaço ainda é um resíduo, especialmente durante o período de safras, onde a grande quantidade de cana colhida gera grandes volumes de bagaço. Existem potencialmente usos não energéticos para o bagaço da cana, alguns deles já viabilizados comercialmente. Merecem destaque seu emprego como matéria-prima na indústria de papel e papelão, na fabricação de aglomerados, na indústria química, como material alternativo na construção civil, como ração animal e na produção de biomassa microbiana. Mesmo assim há ainda um excedente deste resíduo que não é utilizado, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental. Alguns autores afirmam que esse excedente de bagaço pode chegar a 10% em usinas com destilaria anexa ou a 30% em destilarias autônomas (FAPESP, 1998).

O bagaço de cana constitui um conjunto heterogêneo de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25mm (ICIDCA, 1999). As fibras do bagaço da cana contêm, como principais componentes, cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina. A celulose e a hemicelulose são as duas formas de carboidratos mais abundantes da natureza e representam um potencial de reserva para a obtenção de produtos de interesse comercial (FAPESP, 1998). Alguns destes produtos que podem ser obtidos biotecnologicamente ou quimicamente a partir do bagaço de cana estão relacionados na FIGURA 2.4.

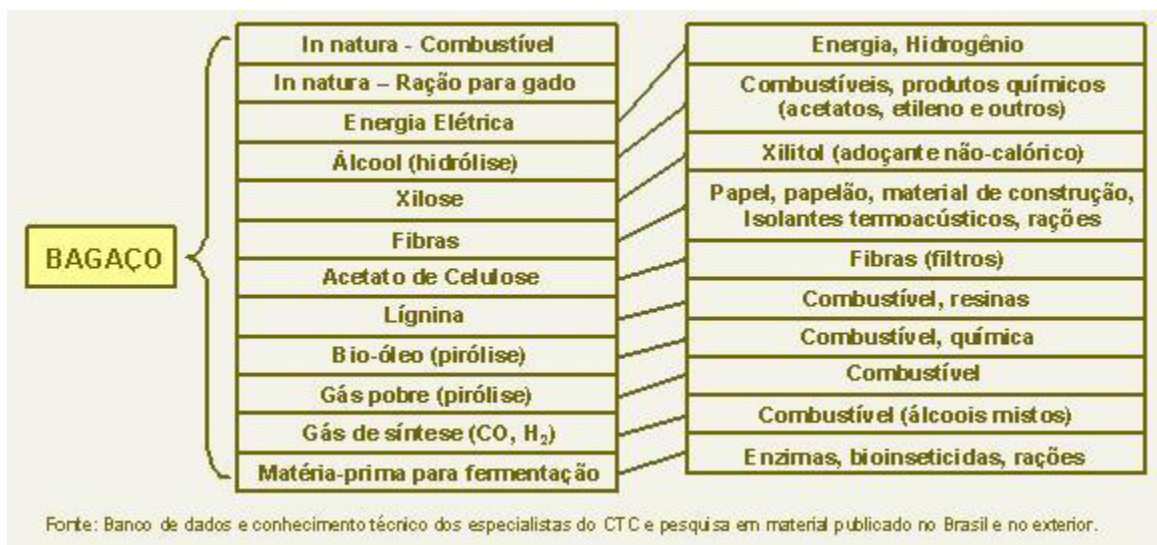


FIGURA 2.4. Relação de produtos que podem ser obtidos a partir do bagaço de cana de açúcar. FONTE: Cooperval.

O bagaço de cana-de-açúcar vem sendo utilizado em diversos trabalhos com resultados promissores (KESKAR, 1992; KARNI et al., 1993; MILAGRES et al., 1993; MILAGRES & PRADE, 1994), sendo que muitos autores apresentaram boas perspectivas na produção de enzimas a partir deste resíduo (REZENDE et al., 2002; ADSUL et al., 2004; BOCCHINI et al., 2005; MAZUTTI et al., 2006). No trabalho de LEMOS et al., 2002, o cultivo de *Aspergillus awamorii* em bagaço de cana, finamente dividido e sem tratamento prévio, favoreceu a produção de níveis elevados de endo-xilanase (100 U/ml) e b-xilosidase (3.5 U/ml) extracelulares. Observou-se uma repressão gradual da atividade endo-xilanásica quando concentrações crescentes de glicose e xilose (1, 2, 4, 6 e 8 g de carboidrato / 4 g de bagaço de cana) foram adicionadas aos meios de produção. Contrariamente, a atividade b-xilosidásica foi estimulada quando níveis baixos de açúcares simples foram utilizados (1 g de xilose ou glicose/ 4 g de bagaço de cana).

#### 2.4.3. Farelo de Soja

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais, sendo sua produção destinada para a obtenção de óleo e farelo, pela indústria alimentícia (POLINUTRI, 2001). Em 2003, o Brasil figurou como o segundo produtor mundial, responsável por 52 das 194 milhões de toneladas produzidas em nível global ou

26,8% da safra mundial, continuando com o segundo lugar na produção em 2005, chegando a 57 milhões de toneladas em 22 milhões de hectares (EMBRAPA, 2004).

Entende-se por farelo de soja o produto resultante da extração do óleo dos grãos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), por processo mecânico e/ou químico (CIDASC). O conteúdo de proteína bruta na matéria seca oscila entre 42,5 a 55,6%, dependendo do método de extração de óleo e processamento (SILVA, 1995).

O farelo de soja, nas mais diversas composições protéicas comerciais (44%, 46% e 48%) tem sido muito utilizado para alimentação animal (de uso para todas as espécies animais), sendo rico em proteínas como a tiamina, colina e niacina (POLINUTRI, 2001).

O farelo de soja (kg) foi cotado de R\$ 0,31 a R\$ 0,45 entre indústrias e cooperativas no Brasil, em 03 de julho de 2006 (FNP, 2006). O preço pode variar de acordo com a disponibilidade, insumos para produção, tipo de farelo (porcentagem de proteína), mas em geral, torna-se um produto relativamente barato com grande potencial de uso como suplemento, fonte de nitrogênio ou substrato em processos biotecnológicos. Em projeções de um mercado futuro de farelo de soja, estima-se que possa chegar até \$179,20 (fechamento em 24/05/2006) por tonelada em janeiro de 2007 (FNP, 2006).

Alguns trabalhos mostram que a produção de xilanase está relacionada a característica da fonte de nitrogênio, encontrando-se diferenças entre a utilização de fontes orgânicas ou inorgânicas. Geralmente, obtém-se bons resultados, em termos de produção de xilanase, fazendo uso de extrato de levedura e peptona na composição dos meios (HALTRICH et al., 1996). Entretanto, estes compostos podem ser substituídos, com sucesso, por materiais de custo muito mais baixo, conforme relatado por LU et al. (2003) que utilizaram farelo de soja e farelo de peixe na produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em escala piloto.

GOMES et al. (1994) avaliaram a influência da fonte de nitrogênio na produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* e verificaram que a indução da enzima ocorreu somente na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica no meio de indução. Os autores, sem especificar os compostos utilizados, relatam que a substituição do nitrogênio orgânico, pela mesma quantidade de nitrogênio

inorgânico, reduziu a atividade de xilanase de 1008 nkatal/mL para 27 nkatal/ml (1UI = 16,67 nkatal), após 120 horas de cultivo.

BAKIR et al. (2001) fizeram uso de farelo de soja, como fonte de nitrogênio, na produção de endo-xilanase por *Rhizopus oryzae* e observaram que, um aumento na concentração deste composto de 1 para 2%, no meio de cultivo, levou a um aumento de 26% na produção de xilanase.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção dos Microrganismos

O isolamento de alguns fungos filamentosos foi realizado em meio de crescimento agar batata dextrosado (PDA) utilizando amostras obtidas do solo, madeira em decomposição e bagaço de cana de açúcar. Um grama (1g) de cada material foi suspenso em 10 mL de água destilada estéril, agitando-se vigorosamente por 15 minutos em shaker a 120 rpm e 28°C. Depois da agitação, foram realizadas diluições sucessivas das amostras, inoculando-se 0,2 mL de cada diluição nas placas de Petri e cobrindo a amostra com 15-20 mL de PDA, realizando movimentos uniformes para homogeneização da amostra com o meio (Pour-Plate). As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 5-7 dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As colônias fúngicas foram cultivadas sucessivamente até a pureza.

Os fungos filamentosos *Aspergillus niger* LPB 326, *Aspergillus niger* LPB 3, *Trichoderma harzianum* LPB 193 e *Trichoderma harzianum* LPB 221 foram obtidos do cepário do Laboratório de Bioprocessos (UFPR) e repicados periodicamente em meio PDA com crescimento a 28°C por 5-7 dias.

#### 3.2. Seleção qualitativa

A seleção das cepas produtoras de xilanase foi realizada através do método de plaqueamento em meio contendo xilana 0,2% (Sigma) como única fonte de carbono e agar (17g/L) de acordo com WHITAKER (2002). As placas contendo o meio xilana-agar foram inoculadas através de um repique pontual com as cepas cultivadas em PDA, e incubadas a 30°C. Após as colônias estarem visíveis, as placas foram cobertas primeiramente por uma solução 1M de NaCl, e depois com uma solução 1% de corante Vermelho do Congo. Quinze minutos depois, a solução corante foi removida e as áreas correspondentes à hidrólise do polissacarídeo foram descoradas por 10 minutos com duas trocas de solução 1M de NaCl e um tratamento final de 20 minutos com uma solução 5M de NaCl. As



cepas que mostraram uma relação halo xilana/halo colônia maior que 1 ( $HX/HC > 1$ ) foram consideradas como produtoras de xilanase.

### 3.3. Caracterização dos substratos

O bagaço de cana (BC) foi cedido pela COCAMAR – Cooperativa Agroindustrial (Cianorte, Paraná), e o farelo de soja pela Cooperativa Agrária Mista Entre Rios Ltda (Guarapuava, Paraná). Os materiais lignocelulósicos foram utilizados sem pré-tratamento químico ou físico (moagem, peneiramento, etc.).

As características físicas e químicas de uma partida de material particulado são determinadas por meio de ensaios com pequenas amostras. As amostras devem ser representativas da partida de sólidos (“bulk quantity”). Um método de amostragem muito utilizado é o das divisões sucessivas (método de coneamento ou quarteamento), que podem ser efetuadas manual ou mecanicamente (SOUZA et al., 2005). Para a amostragem foi utilizado o método do quarteamento, a partir do qual foram obtidas três amostras, as quais foram utilizadas nos ensaios para caracterização física e química do material.

Foram realizadas análises granulométricas das três amostras obtidas pelo quarteamento para verificar a composição granulométrica do material utilizado nas fermentações. Nas análises foram utilizadas uma série de peneiras com diferentes aberturas (0,5 – 2,83 mm) ou “mesh” ( $7 \leq \text{mesh} < 35$ ) dispostas em forma de uma pilha de modo que cada uma das peneiras inferiores tenham abertura menor que as superiores. A unidade disposta no fundo da pilha consiste no coletor de finos, sem perfurações. O conjunto foi disposto em um equipamento gerador de vibração. Terminada a análise, foram quantificadas as massas de cada uma das peneiras cuidadosamente.

As análises físico-químicas dos substratos foram realizadas de acordo com a metodologia padrão descrita na A.O.A.C. (2000), sendo cinzas e umidade analisadas pelo método termogravimétrico e proteínas pelo método de KJELDAHL (1883). Os açúcares totais (hidrólise ácida com HCl concentrado) foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1952). O pH das amostras foi determinado com auxílio de um pHmetro de bancada (HD107BC), suspendendo 1 g de substrato em 10mL de água deionizada por 10 minutos.

Foram investigadas as proporções de farelo de soja e bagaço de cana na composição do substrato para uma melhor indução na produção de xilanase, de acordo com a Tabela 3.1. Testes de absorção de água também foram realizados utilizando 10 g da melhor proporção dos substratos em frascos do tipo Becker e colocando quantidades variadas de água (50 mL e 100 mL), homogeneizando e medindo em proveta a quantidade de água residual, para se avaliar a capacidade de retenção de líquidos (o que é importante para se ajustar umidades altas sem permitir a descaracterização de uma fermentação no estado sólido).

TABELA 3. 1. Proporções de Bagaço de cana e Farelo de soja estudados em FES

Bagaço de cana (%)	Farelo de soja (%)
100	0
75	25
65	35
50	50

#### 3.4. Extração da hemicelulose/xilana do bagaço de cana

A extração alcalina da hemicelulose/xilana do bagaço de cana foi realizada de acordo com o método descrito por DELOPEZ (1996). Uma solução de NaOH 13% aquecida (60°C) foi preparada para umedecer o substrato numa proporção fixa de 3:1 (relação líquido:substrato). Essa mistura foi levada a banho-maria ajustado a 60°C por 2 horas. Após o tratamento, o resíduo de bagaço de cana foi lavado 3 vezes com água quente (60°C) na proporção de 1:4 (substrato:água), sendo pressionado para extrair o máximo possível e liberar a fração hemicelulósica no líquido resultante. O licor foi recuperado em um frasco de 2 L. Esta operação foi repetida 3 vezes. Os três volumes foram combinados e filtrados numa peneira com 200 µm de abertura para remover as fibras celulósicas. O filtrado hemicelulósico foi acidificado com ácido acético até pH 5,0 e concentrado com um roto-evaporador. O volume do filtrado foi reduzido em 1/3. Etanol 95% foi adicionado numa razão de etanol/filtrado de 2:1. O filtrado hemicelulósico foi deixado de um dia para outro a 4°C para precipitação. O precipitado hemicelulósico foi coletado por centrifugação (10 minutos, 3500 rpm), lavado com

200 mL de etanol e centrifugado novamente. A fração hemicelulósica foi finalmente recuperada e congelada, sendo parte dela liofilizada.

A fração congelada foi utilizada para realizar testes qualitativos em placa de modo a substituir a xilana padrão na seleção de microrganismos produtores de xilanase. Diferentes concentrações da fração (0,2%, 0,5% e 1%) foram estudadas para obter a melhor aproximação da seleção realizada com a xilana padrão, sendo esta fração a única fonte nutricional disponível. Com a utilização da fração hemicelulósica foi possível selecionar de forma mais ampla os microrganismos, visto que teriam capacidade hemicelulolítica produzindo provavelmente outras enzimas além da xilanase.

### 3.5. Preparação do inóculo

Após o crescimento do microrganismo em frascos Erlenmeyer contendo PDA (meio de crescimento), os esporos foram suspensos em uma solução estéril contendo Tween 80 0,1% e NaCl 0,9% juntamente com pérolas de vidro e uma barra magnética e colocados sob agitação por aproximadamente 15 minutos. Após a extração a solução contendo os esporos foi submetida a diluições sucessivas para contagem em câmara de Neubauer, de modo a obter uma concentração padrão de  $10^6$  esporos/g de substrato.

### 3.6. Condições iniciais da FES e seleção quantitativa

Os experimentos iniciais de produção de xilanase e seleção quantitativa foram realizados utilizando 10g de substrato, dispostos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, composto por 65% de BC e 35% de FS contendo 10 mL de uma solução mineral composta por (g/L):  $K_2HPO_4$ , 0,23;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,05;  $CaCl_2$ , 0,005;  $NaNO_3$ , 0,05;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,009;  $ZnSO_4$ , 0,002 and  $MnSO_4$ , 0,012. O pH inicial foi ajustado para 6,5 com tampão citrato de sódio. A umidade inicial utilizada foi de 80%, ajustada pela adição de água destilada. Para o cálculo de massa de água a ser adicionada para o ajuste da umidade inicial, a seguinte equação (Eq. 1) foi utilizada:

$$mH_2O = \frac{ms(x_2 - x_1)}{1 - x_2} \quad (1)$$

onde,  $mH_2O$  = massa de água a ser adicionada;  $ms$  = massa de substrato seco;  $x_1$  = porcentagem inicial de umidade do substrato;  $x_2$  = porcentagem final de umidade desejada.

O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, os frascos Erlenmeyer foram inoculados com uma concentração de esporos de  $10^6$  esporos/g e incubados sob condições estáticas de cultivo em estufa a 28 °C.

A seleção quantitativa das cepas produtoras de xilanase (selecionadas qualitativamente de acordo com o item 4.2.) foi conduzida em FES durante 7 dias com análises realizadas no 1º, 3º, 5º e 7º dias de fermentação. Posteriormente foi realizada uma segunda seleção entre as duas melhores cepas durante 10 dias, com análises diárias de atividade enzimática, pH, umidade e  $a_w$ , para se definir a cepa de trabalho e obter alguns dos parâmetros de fermentação relacionados a melhor cepa para posterior otimização do processo.

### 3.7. Curva de crescimento e viabilidade

Uma curva de esporulação e de viabilidade foi realizada durante 10 dias com a cepa selecionada dentre os testes qualitativo e quantitativo, para se obter o melhor dia de interromper o crescimento (maior quantidade de esporos e colônias viáveis durante a fase logarítmica) e iniciar a fermentação. A cepa foi inoculada em frascos Erlenmeyer contendo meio de crescimento e os esporos foram extraídos e contados (de acordo com o item 4.3) a cada 24 horas. As soluções de esporos foram diluídas em água peptonada 0,1% estéril para plaqueamento e posterior contagem de células/colônias viáveis expressas em UFC/mL.

### 3.8. Extração da enzima

Após a incubação, o substrato foi homogeneizado e 3g de substrato fermentado foi pesado e acondicionado em frascos de vidro, seguindo-se com adição de 30 mL de uma solução de extração (NaCl 0.9% + Tween 80 0.1%) e agitação por 5 minutos. Os componentes sólidos foram separados através de filtração em bomba a vácuo utilizando papel de filtro Whatman n° 01. O filtrado foi utilizado com fonte de enzima xilanólítica extracelular (extrato cru).

### 3.9. Ensaio enzimáticos

A atividade da xilanase foi determinada utilizando como substrato a xilana do tipo glucuronoxilana ou "birchwood" (Sigma, USA) na concentração de 1%, de acordo com o método de BAILEY et al. (1992), utilizando tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,3 para diluir a enzima e temperatura de incubação de 50°C. Os açúcares redutores liberados pela ação da enzima foram estimados utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), sendo a xilose o açúcar redutor padrão. Em todas as análises foram incluídos os brancos enzimáticos. A leitura das absorbâncias, posteriormente convertidas em atividade enzimática a partir de uma curva padrão, foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu (UV-1650 PC), com comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de matéria seca (UI/g).

A atividade das celulasas foi determinada de acordo com o método descrito por GHOSE (1987), utilizando carboximetilcelulose (CMC 2%) e papel de filtro Whatman n.1 como substratos para celulase e endo- $\beta$ -1,4-glucanase, respectivamente, as quais foram expressas em unidades por mililitro (U/mL).

### 3.10. Delineamentos experimentais

Foram utilizados delineamentos experimentais do tipo fatoriais completos e fracionados (para determinação das condições físicas de fermentação e da

extração da enzima) além da matriz de Plackett-Burman (para seleção de sais na composição do meio).

Delineamentos fatoriais fracionados podem ser utilizados para seleção e determinação de componentes do meio (num meio já formulado), ou parâmetros fermentativos os quais podem ter um efeito significativo e podem ser otimizados. Entretanto, delineamentos do tipo Plackett-Burman são mais eficientes para propostas de seleção, se não são conhecidos quais componentes deveriam ou não estar presentes no meio. A composição do meio de produção é um parâmetro chave na otimização de processos em fermentação no estado sólido, porque os fatores nutricionais tais como a fonte de carbono, e os níveis de nitrogênio e metais, podem influenciar o crescimento e produção de metabólitos, enzimas e esporos (OOIJKAAS, 2000).

Os experimentos estatísticos e as análises foram conduzidos através do software STATISTICA 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

#### 3.10.1. Otimização pH, temperatura e umidade

Um delineamento fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$  resultando em 9 experimentos, realizados em duplicata, foi utilizado para determinar a condição ótima das variáveis pH, temperatura e umidade inicial, e também demonstrar a influência dessas variáveis na produção de xilanase. As variáveis codificadas e não-codificadas estão presentes na Tabela 3.2. Inicialmente em relação à umidade utilizava-se o valor de 80%, deste modo, este foi o ponto central deste parâmetro. Baseando-se em dados da literatura, onde a maioria da xilanases fúngicas foi produzida em pH ácido ou próximo do neutro (DESCHAMPS et al., 1985; ANGELO, 1995; PARK et al., 2002; BAKRI et al., 2003), a variação de pH de 4-6 foi escolhida. A temperatura de 28°C (temperatura de crescimento do fungo e utilizada nos primeiros experimentos) foi colocada no nível inferior, avaliando-se o efeito de temperaturas mais altas.

TABELA 3.2. Variáveis e níveis do delineamento experimental para otimização das variáveis umidade, pH e temperatura.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	1
Umidade (%)		75	80	85
pH		4	5	6
Temperatura (°C)		28	30	32

Experimentos	Variáveis		
	Umidade (%)	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	-1
2	-1	0	1
3	-1	1	0
4	0	-1	1
5	0	0	0
6	0	1	-1
7	1	-1	0
8	1	0	-1
9	1	1	1

Os resultados foram ajustados ao seguinte modelo quadrático (Eq. 2):

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (2)$$

### 3.10.2. Otimização pH e umidade

Um delineamento experimental completo  $3^{2-0}$ , levando a 9 experimentos, foi realizado em duplicata para se determinar a condição ótima das variáveis pH e umidade inicial, partindo dos resultados obtidos na otimização anterior, onde a temperatura ótima foi definida (30°C), restando pH e umidade. As variáveis reais e codificadas estão presentes na Tabela 3.3. Os resultados foram ajustados pelo mesmo modelo quadrático do item 4.9.1 .

TABELA 3.3. Níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial completo ( $3^{2-0}$ ) para otimização do pH e umidade

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
pH	4.0	4.5	5.0
Umidade Inicial (%)	79	82	85

### 3.10.3. Otimização da extração da enzima

Os parâmetros de extração foram estudados através da metodologia de superfície de resposta, utilizando em um primeiro experimento (Tabela 3.4) um delineamento completo em 3 níveis, com dois fatores (tempo e volume de solução),  $3^{(2-0)}$ , resultando em 9 experimentos, os quais foram conduzidos em duplicata.

TABELA 3.4. Variáveis e níveis avaliados no primeiro estudo de otimização da extração da xilanase.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (minutos)	2,5	5	7,5
Volume (mL)	20	30	40

Em um segundo experimento, foram avaliados novamente o tempo de extração (minutos) e o volume de solução (mL), incluindo a agitação (rpm) realizada em shaker, como mais um parâmetro (Figura 3.5). Neste estudo, foi utilizado um delineamento fracionado em 3 níveis, com 3 fatores,  $3^{(3-1)}$ , resultando em 9 experimentos, os quais também foram conduzidos em duplicata. Separadamente, foi realizado um estudo onde 5 solventes foram avaliados quanto à capacidade de recuperação da xilanase, escolhidos com base na literatura (HECK et al., 2005; REZENDE et al., 2002), de modo a se extrair do substrato a maior quantidade possível da enzima produzida. Os solventes estudados foram: tampão acetato de sódio pH 5,0, tampão citrato de sódio pH 5,3, água deionizada, água deionizada + Tween 80 0,1% e água deionizada + Tween 80



0,1% + NaCl 0,9%. Também foi estudado o efeito da centrifugação (3.500 rpm por 10 minutos) nas amostras extraídas com água deionizada.

TABELA 3.5. Variáveis e níveis avaliados no segundo estudo de otimização da extração da xilanase.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (minutos)	10	30	50
Volume (mL)	20	30	40
Agitação (rpm)	100	120	140

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras de uma fermentação nas condições otimizadas de pH, umidade e temperatura.

#### 3.10.4. Efeito da composição química – solução mineral

O delineamento estatístico Plackett-Burman foi escolhido para o estudo da otimização da composição química da solução mineral a ser adicionada no substrato para melhorar a produção de xilanase. Este parâmetro estatístico permite a investigação de  $n-1$  variáveis com  $n$  experimentos. Todos os experimentos são conduzidos de acordo com a matriz do delineamento experimental, a qual é baseada no número de variáveis a serem estudadas. Um delineamento Plackett-Burman (one-way) de 11 fatores, resultando em 12 corridas, realizadas em duplicata, foi utilizado para se determinar os sais mais significativos na produção de xilanase. Todos os valores obtidos das replicatas foram utilizados nas avaliações estatísticas. Os sais testados foram os seguintes, em g/L: (1)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.23; (2)  $\text{MgSO}_4$ , 0.07; (3)  $\text{CaCl}_2$ , 0.04; (4)  $\text{NaNO}_3$ , 0.37; (5)  $\text{FeSO}_4$ , 0.005; (6)  $\text{MnSO}_4$ , 0.012; (7)  $\text{ZnSO}_4$ , 0.002; (8)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.23; (9) KCl, 0.12; (10)  $\text{CuSO}_4$ , 0.05; (11)  $\text{CoSO}_4$ , 0.0005.

A escolha dos sais para o experimento foi feita de acordo com referências da literatura (HALTRICH et al., 1996; GAWANDE e KAMAT, 1999; COURI et al., 2000; PARK et al., 2002), considerando os sais e concentrações que foram

empregados durante os experimentos iniciais e de seleção em FES neste trabalho.

### 3.10.5. Concentração dos sais

Com o objetivo de encontrar a concentração ótima dos sais selecionados no experimento anterior, um delineamento fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$  foi utilizado, resultando em 9 ensaios, realizados em duplicata. Os sais selecionados e as concentrações estudadas estão descritos na tabela 3.6.

TABELA 3. 6. Valores de concentração (g/L) dos sais selecionados previamente para o estudo de otimização

Sais	Concentração (g/L)		
	-1	0	+1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	1.5	2
$\text{CuSO}_4$	0.2	0.4	0.6
$\text{CoSO}_4$	0.0004	0.0012	0.002

### 3.11. Estudo de controle do pH inicial

Alguns testes relacionados com a influência do pH inicial e o tipo de ajuste foram realizados, a fim de se obter uma melhor avaliação dos efeitos dessa variável no processo fermentativo, levando-se em consideração os resultados obtidos nos estudos de otimização desta variável. Para isso, foram realizadas diferentes fermentações em duplicata, preparadas de acordo com a Tabela 3.7.

TABELA 3.7. Investigação dos efeitos do pH inicial

Teste	Componentes líquidos	pH
1	Água deionizada + sais minerais	Não ajustado (natural do substrato)
2	Água pH 4,0 + sais minerais	Ajustado inicialmente para 4,0 (solução ácido clorídrico 0,1M)
3	Tampão pH 4,0 + sais minerais	Tamponado em pH 4,0

### 3.12. Efeito de alguns aditivos na produção da xilanase em FES

O substrato otimizado (considerado padrão) foi complementado com alguns aditivos para se testar a produção de xilanase: Padrão+Glicerol (1%), Padrão+Sulfato de Amônio (10 g/L) e Padrão+Tween 80 (0,5%).

### 3.13. Estudo de secagem do material fermentado

Em um primeiro estudo o material fermentado contendo xilanase, o qual foi obtido por FES com *A. niger* LPB 326, foi submetido às condições de secagem presentes na Tabela 3.8, para se avaliar o efeito da temperatura na estabilidade enzimática. Após o tratamento térmico, avaliou-se a atividade enzimática de xilanase pelo método descrito no item 3.9.

Tabela 3.8. Condições de secagem empregadas no material fermentado contendo xilanase

Experimentos	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
1	42	20
2	50	20
3	80	1

Em um segundo estudo, o material fermentado a partir das cepas *A. niger* LPB 326 e LPB BC (composto pelo substrato+fungo+enzima) foi submetido à secagem em estufa na temperatura de 50°C por 6 horas e na temperatura de

75°C por 3 horas, de modo a reduzir significativamente a  $a_w$  presente no substrato e inibir o crescimento fúngico. Parte do material recebeu um pré-tratamento com uma solução de cloreto de cálcio 0,2 M, para se avaliar a estabilidade da xilanase ao se introduzir uma fonte de cálcio (BANDIVADEKAR e DESHPANDE, 1994), a qual foi borrifada sobre o fermentado antes da secagem em ambas as temperaturas aplicadas. Após a secagem o material foi analisado quanto à atividade xilanolítica remanescente, de acordo com o item 3.9.

### 3.14. Propriedades do extrato enzimático bruto

#### 3.14.1. Caracterização enzimática

A temperatura e pH ótimos de reação da xilanase do extrato cru foram determinados pela análise da atividade enzimática em diferentes temperaturas (40, 50, 60 e 70°C) utilizando um banho-maria, e em diferentes pH do substrato (variando de 3 a 8). A cada temperatura, a enzima (0,2 mL) foi incubada por 5 minutos juntamente com o substrato (1,8 mL) ajustado aos diferentes pHs através dos tampões citrato de sódio (pH 3 – 5) e fosfato de sódio (pH 6 – 8).

#### 3.14.2. Estudo da estabilidade em relação ao pH e temperatura

O extrato cru enzimático foi diluído 10 vezes utilizando os tampões citrato de sódio (pH 4 e 5) e fosfato de sódio (pH 6 – 8) para se estudar a influência do pH na atividade enzimática. A atividade residual foi estimada a cada 1 hora durante um período de 5 horas.

Para se avaliar a estabilidade da xilanase produzida em relação à temperatura, o extrato cru enzimático (10 mL) foi incubado à 50 e 60°C na presença e ausência de 0,1g de: glicerol, manitol, xilana padrão e xilana extraída do BC, por 5 à 30 minutos (com análises em intervalos de 5 minutos) em um banho-maria mantido nas respectivas temperaturas. Alguns estudos anteriores com presença de cobre e cálcio na concentração 1M, mostraram ser inibitórios. A atividade enzimática residual foi medida de acordo com o item 3.9, sendo realizados também os cálculos da constante de inativação e meia vida da enzima.

### 3.14.3. Efeito do congelamento sobre a atividade de xilanase

O extrato enzimático bruto foi submetido ao congelamento em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , na presença de glicerol, xilana padrão (SIGMA) e xilana extraída do bagaço de cana (xilana BC), todos na concentração de 0,1%. Uma amostra sem tratamento foi congelada nas mesmas condições para comparação. A atividade residual foi analisada de acordo com o item 3.9.

### 3.14.4. Efeito da presença de metais

O extrato cru foi incubado com soluções 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  por 1 hora à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A atividade residual foi medida de acordo com o item 3.9.

### 3.14.5. Determinações cinéticas enzimáticas

As taxas iniciais de reação da hidrólise da glucuronoxilana padrão (Birchwood xylan, SIGMA) foram determinadas sob diferentes concentrações do substrato variando de 5 a 20 mg de substrato/mL de tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5,3 à  $50^{\circ}\text{C}$ . As constantes  $K_m$  e  $V_{m\text{áx}}$  foram estimadas de acordo com o método de LINEWEAVER e BURK (1934).

### 3.15. Cinética final de produção em frascos Erlenmeyer

Durante 7 dias de fermentação foram avaliados os seguintes parâmetros: produção de xilanase, evolução do pH, umidade final,  $a_w$  e consumo de açúcares, de acordo com suas metodologias respectivas (Tabela 3.9).

TABELA 3.9. Análises realizadas na cinética final e suas metodologias.

ANÁLISES	MÉTODO
Produção de xilanase	BAILEY et al. (1992)
Evolução do pH	Potenciométrico (pHmetro HD107BC)
Umidade final	Balança determinadora de umidade (BEL Top Ray BE-001)
$a_w$	Determinador de $a_w$ (Aqualab CX2T)
Consumo de açúcares	SOMOGYI-NELSON (1952)

### 3.16. Fermentação em Coluna Aeradas

Um estudo de mudança de sistema fermentativo foi realizado utilizando-se um biorreator do tipo colunas de aeração forçada, a partir das condições otimizadas em frascos Erlenmeyer. Inicialmente fez-se uma otimização de dois importantes parâmetros fermentativos (aeração e umidade) para se encontrar as melhores condições para produção de xilanase em colunas. Após a definição das melhores condições, será realizada a análise respirométrica da fermentação em colunas e correlação entre produção de gases e a biomassa.

As colunas vazias, bem como os borbulhadores de ar de 250 mL (contendo 200 mL de água deionizada) foram esterilizados separadamente a 121°C por 15 minutos. O substrato foi esterilizado separadamente em frasco do tipo Becker. A inoculação foi realizada no próprio béquer e após homogeneização, as colunas foram preenchidas, assepticamente, com aproximadamente 43 g de substrato úmido (previamente inoculado) em câmara de fluxo laminar. Cada coluna foi pesada antes e após preenchimento com o substrato. Posteriormente, as colunas foram conectadas aos borbulhadores de ar, verificando se estavam bem vedadas, e introduzidas na cuba de vidro que continha água com temperatura controlada a 30°C (FIGURA 3.1). A aeração (mL/g.min – mililitro de ar por grama de substrato úmido por minuto) foi ajustada até o valor desejado de fluxo de ar e controlada com o auxílio de um rotâmetro encaixado na saída de ar da coluna.



FIGURA 3.1. Fermentações em colunas aeradas.

### 3.16.1. Otimização da aeração e umidade em colunas

Os níveis de umidade a serem estudados foram definidos a partir do valor obtido como correspondente a melhor umidade em frascos erlenmeyer. Três níveis de aeração foram estudados para se encontrar a taxa ideal. O delineamento experimental utilizado foi  $2^{(2-0)}$  completo com adição de 2 pontos centrais, resultando em 6 ensaios. Os valores reais e codificados estudados para cada variável são apresentados na Tabela 3.10.

TABELA 3.10. Condições empregadas para otimização da aeração e umidade em colunas

Variáveis	Níveis		
	-1	pt central	+1
Aeração (mL/g.min)	1,4	1,86	2,33
Umidade inicial (%)	75	80	85

Após 4 dias de fermentação, as colunas foram retiradas e analisadas quanto à atividade de xilanase produzida.

### 3.17. Liofilização do extrato bruto enzimático

O extrato bruto, obtido após o processo de extração do fermentado, foi testado em relação à manutenção da atividade xilanolítica após a liofilização (Liofilizador ModulyoD, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Em pequenos frascos de vidro foram colocados 5 mL do extrato cru enzimático, sendo também adicionados manitol e leite em pó desnatado, individualmente, nas concentrações de 1-4%, para se avaliar os efeitos de conservação e estabilidade. Os frascos foram pré-congelados à -20°C, sendo então colocados nas bandejas do liofilizador. Deixou-se liofilizar até a pressão de vácuo de  $5 \times 10^{-2}$  mbar. Para análise de atividade enzimática, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com tampão citrato de sódio 0,05M (pH 5,3). A atividade residual foi imediatamente determinada e expressa como a porcentagem de atividade obtida antes da liofilização.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção dos Microrganismos e Seleção qualitativa

Um total de 15 cepas de fungos foram isoladas no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB), sendo quatro obtidas a partir da madeira, nove do solo e duas do bagaço de cana. O teste qualitativo realizado nas placas contendo xilana-agar (FIGURA 4.1) mostrou que dentre os 20 fungos (15 isolados mais cinco cepas da coleção de culturas do LPB, incluindo uma cepa bacteriana de *Streptomyces sp.*), 16 produziram halos resultantes do consumo de xilana. A partir das cepas que produziram halos, sete linhagens foram selecionadas para o teste quantitativo, considerando os maiores diâmetros dos halos produzidos, ou índice enzimático (Halo de xilana/Halo da colônia > 1,2).

De acordo com TEN *et al.*, 2004, o diâmetro do halo produzido é muito útil como um auxiliar para selecionar cepas com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos. Além disso, o índice enzimático pode ser utilizado, como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes, o que foi verificado com sucesso em linhagens de bactérias (TEATHER & WOOD, 1982).

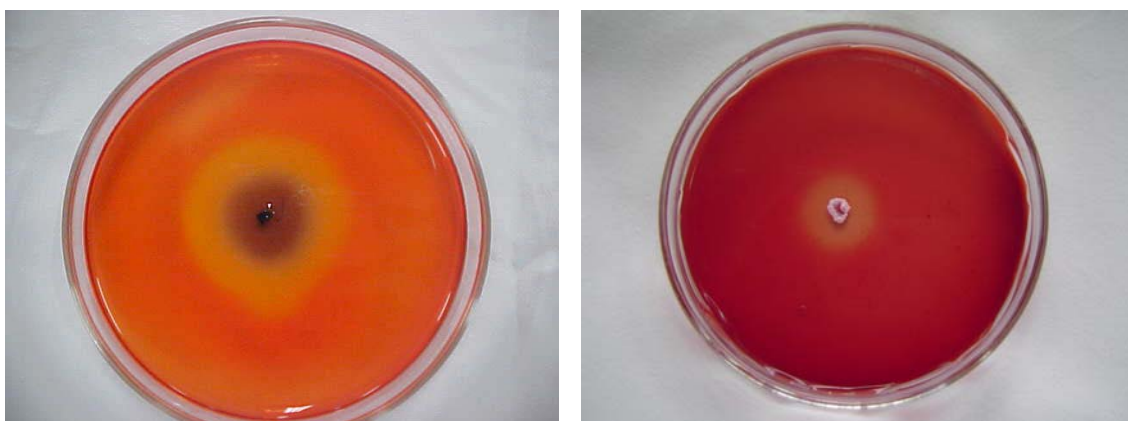


FIGURA 4. 1. Regiões mais claras e colônias de microrganismos produtores de xilanase em placas contendo xilana-agar corada com vermelho do congo ( os halos amarelos indicam o consumo de xilana). À esquerda: *Aspergillus niger*; À direita: *Streptomyces sp.*

#### 4.2. Condições iniciais da FES e Seleção quantitativa

No teste quantitativo, as mesmas condições de cultivo em FES foram utilizadas para todas as linhagens, sendo escolhidas de acordo com dados da literatura (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999; PANDEY et al., 1999), buscando alternativas econômicas que também pudessem suprir aos microrganismos nutrientes básicos necessários para o crescimento, e condições de temperatura, umidade inicial e pH, adequados para a produção da enzima de interesse.

A Tabela 4.1 apresenta as atividades de xilanase (UI/mL) para todas as cepas selecionadas qualitativamente. Os microrganismos com as atividades enzimáticas mais elevadas foram da espécie *Aspergillus niger* (obtidos da coleção de culturas do LPB), os quais também figuraram entre os produtores dos maiores halos no teste em placa xilana-agar (TABELA 4.2).

TABELA 4.1. Resultados da seleção quantitativa em FES. As atividades enzimáticas estão expressas em UI/mL.

DIAS DE ANÁLISE	<i>A. niger</i> LPB 3†	<i>A. niger</i> LPB326†	LPB 139	LPB 142	LPB 147	LPB BC	<i>T. harzianum</i> LPB 221†
3	200	212	36	2	6	141	36
5	269	217	57	4	10	147	33
7	170	108	19	13	9	119	32
10	111	110	3	7	6	98	6

†Cepas obtidas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

No entanto, o tamanho do halo produzido no teste qualitativo, ou o índice enzimático, não correspondeu necessariamente à maior produção da enzima em FES, provavelmente porque as condições utilizadas para a fermentação poderiam não ser as melhores para todas as cepas (temperatura, tempo, nutrientes, etc.). De uma forma geral, o teste qualitativo auxilia na escolha das cepas que produzem a enzima de interesse, e dentre os que produzem os maiores halos, poderão ser encontrados aqueles que produzem as maiores quantidades de enzima (TEN et al., 2004). De acordo com as condições escolhidas para a FES, alguns se adaptarão mais facilmente e poderão ser melhores na fermentação do

que no teste em placa. Daí a importância de se realizar um teste quantitativo antes de descartar cepas promissoras.

TABELA 4.2. Índice enzimático (placa contendo xilana 0,2% e agar) e atividade das xilanases produzidas pelas cepas selecionadas qualitativamente.

Microrganismos	Índice enzimático	Atividade (UI/gms)
10 PAF	1,53	165
<i>A. niger</i> LPB326	1,42	1.085
45 BLUE	1,41	285
148 B	1,2	50
<i>A. niger</i> LPB BC	1,19	735
<i>A. niger</i> LPB3	1,1	1.346
142 GREEN	1,03	35

A Figura 4.2 mostra as atividades de xilanase pelo tempo para os três melhores microrganismos produtores de xilanase na seleção quantitativa.

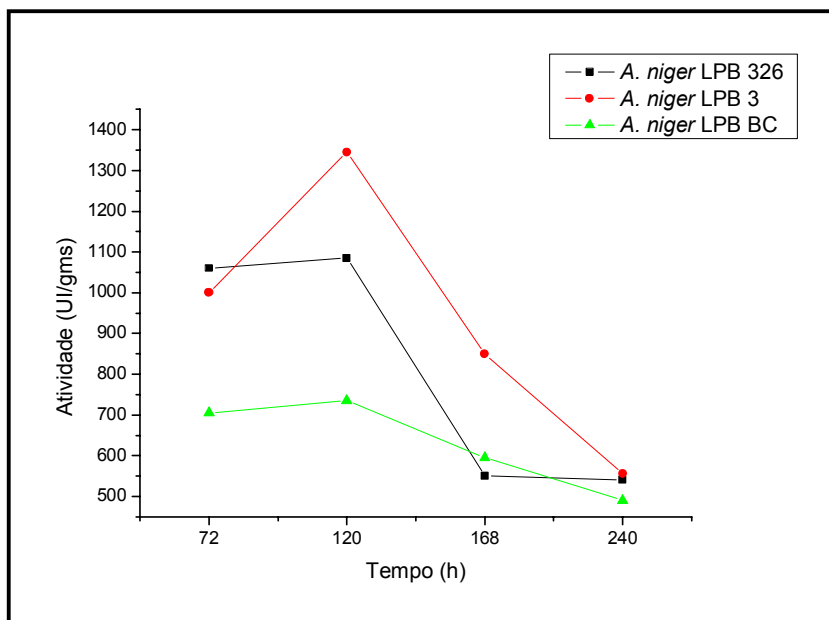


FIGURA 4. 2. Perfil de produção de xilanase em relação ao tempo de fermentação (horas), para as três melhores cepas.

Duas cepas mostraram os maiores valores de atividade de xilanase, 1.085 UI/gms e 1.346 UI/g de matéria seca inicial, no quinto dia de fermentação, correspondendo respectivamente a *A. niger* LPB 326 e *A. niger* LPB 3, obtidas da coleção de culturas do LPB. Uma linhagem isolada a partir do bagaço de cana, denominada *A. niger* BC, atingiu uma atividade de xilanase de 735 UI/g de matéria seca, no quinto dia de fermentação.

Estas atividades obtidas foram consideradas relativamente boas para um estudo inicial e promissoras se comparadas com alguns dados da literatura.

GAWANDE & KAMAT (1999), conseguiram a melhor produção de xilanase utilizando uma cepa de *A. niger* e farelo de trigo como substrato, resultando numa atividade de 74,5 UI/mL, após 4 dias de incubação. Esta atividade obtida mesmo depois da otimização do processo ainda é 3,6 vezes menor que a atividade obtida com *A. niger* LPB 3 neste trabalho (269 UI/mL). SENTHILKUMAR et al. (2005), obteve uma atividade de xilanase de 1.024 U/g de farelo de trigo em FES utilizando *Aspergillus fischeri*, após a otimização do processo, a qual foi menor que a máxima atividade de xilanase de 1.346 UI/gms, obtida nesta fase inicial do trabalho. SHAMALA et al. (1986), estudando a produção de celulasas e D-xilanase em FES por alguns fungos isolados, alcançou a atividade máxima de xilanase de 740 UI/g utilizando palha de arroz com *Aspergillus ustus*.

A partir destes primeiros resultados de seleção quantitativa, as duas melhores cepas (*A. niger* LPB 3 e *A. niger* LPB 326) foram escolhidas para um estudo cinético, nas mesmas condições de fermentação utilizadas anteriormente, a fim de concluir a seleção da cepa para a realização deste trabalho.

A maior atividade foi obtida pela cepa LPB 326, no quarto dia de fermentação, correspondendo a 1.477 UI/g de matéria seca, com pH de 6,21 (FIGURA 4.3a) e  $a_w$  de 0,987 (FIGURA 4.4a). É interessante notar que a maior atividade para esta linhagem ocorreu no quarto dia, o que não havia sido avaliado no primeiro estudo quantitativo (fermentações retiradas no terceiro, quinto, sétimo e décimo dias), visto que no quinto dia ocorre uma queda na atividade enzimática e, portanto, se este estudo cinético não tivesse sido realizado, provavelmente a cepa LPB 3 teria sido escolhida devido ao maior valor de atividade enzimática no primeiro estudo.

Neste segundo teste, a cepa LPB 3 apresentou o maior valor de atividade enzimática no quinto dia, que acabou confirmando os dados do primeiro estudo;

no entanto, as atividades foram mais baixas que àquelas obtidas para a LPB 326 durante o estudo cinético. Os dados obtidos pela cepa LPB 3 estão mostrados nas Figuras 4.3b e 4.4b, onde a atividade enzimática máxima foi de 1.009 UI/gms, com pH 5,52 e  $a_w$  de 0,984.

A máxima atividade de xilanase coincide com o menor valor de pH para LPB 326, sendo que uma redução no valor de pH concomitante ao aumento da produção de xilanase também é notada para a cepa LPB 3; esta acidificação pode ser provavelmente devido à produção inicial de ácidos orgânicos pelo microrganismo, e com o início do consumo do mesmo, o pH começa a subir.

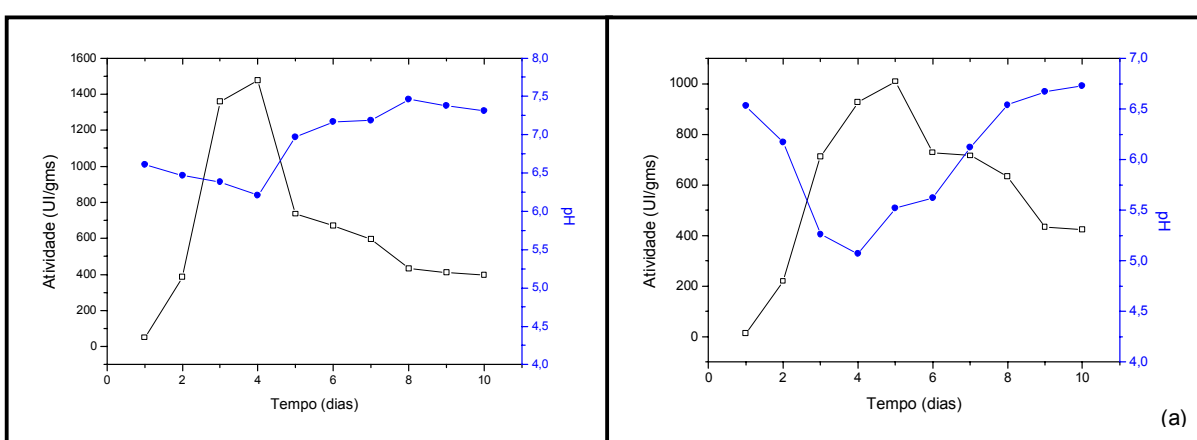


FIGURA 4. 3. Estudo cinético em FES para *A. niger* LPB 326 (a) e LPB 3 (b), mostrando os valores de atividade enzimática ( $\square$ ) em UI/gms e de pH ( $\bullet$ ) obtidos durante 10 dias.

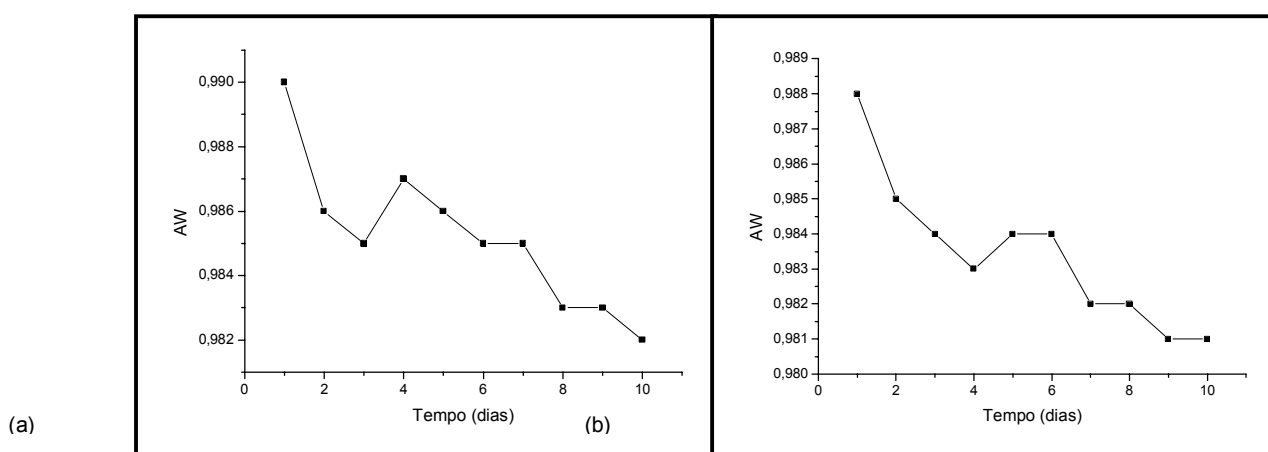


FIGURA 4. 4. Perfis de atividade de água para *A. niger* LPB 326 (a) e LPB 3 (b) durante os 10 dias de fermentação.

A atividade de água diminui consideravelmente nos primeiros dias de fermentação, provavelmente devido ao consumo de água para o metabolismo microbiano, mostrando um pequeno aumento durante a produção máxima da enzima para ambas as cepas, e diminuindo novamente até o final da fermentação.

Após todos os testes realizados, a cepa *Aspergillus niger* LPB 326 foi selecionada para a realização deste trabalho, devido principalmente às máximas atividades enzimáticas produzidas por este microrganismo em um tempo menor (4 dias).

#### 4.3. Curva de crescimento e viabilidade

Os dados obtidos das curvas de crescimento e viabilidade podem indicar o tempo ideal para se preparar o inóculo para as fermentações com uma determinada cepa e por quanto tempo ela é viável. A Figura 4.5a apresenta o número de esporos (esporos/mL) e número de UFC (unidades formadoras de colônia/mL) para *Aspergillus niger* LPB 326.

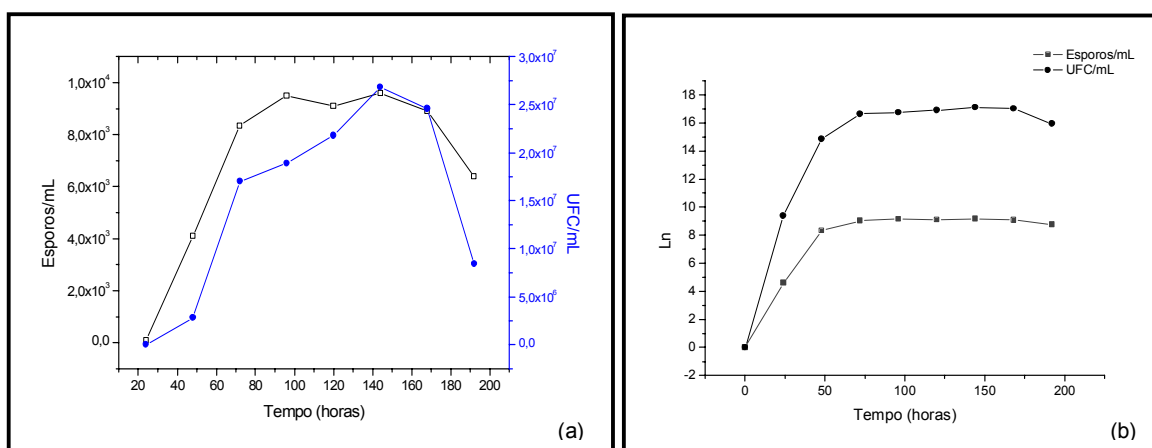


FIGURA 4. 5. Curvas de crescimento mostrando em: (a) o número de esporos produzidos (□) e de colônias formadas (●) em 192 horas por *A. niger* LPB 326; (b) gráfico de crescimento em escala logarítmica.

Mesmo tendo seu pico em quantidade de esporos em 96 horas (mantendo um crescimento estacionário entre 96 e 144 horas), a maior viabilidade se dá em 144 horas com posterior queda. Nota-se também que a velocidade de

crescimento é reduzida a partir do terceiro dia (72 horas). No entanto, a Figura 4.5b mostra outro gráfico com os mesmos dados, mas em escala logarítmica, o que auxilia a visualizar os pontos de crescimento em outra perspectiva.

No gráfico apresentado na Figura 4.5b a quantidade de esporos totais e viáveis é atingida no terceiro dia, com uma fase estacionária subsequente e posterior declínio. De acordo com ambos os gráficos, a interrupção do crescimento foi realizada entre o terceiro e quarto dias (72 – 96 horas), pois desta forma, pôde-se obter o maior número de esporos possíveis, com boa viabilidade, a qual ainda não estaria próxima do declínio, mas em aumento de acordo com a Figura 4.5a. Na Figura 4.6. podem ser visualizadas as fases de crescimento de *A. niger* LPB 326 (mostrando os esporos ou conídios, conidióforos e hifas).

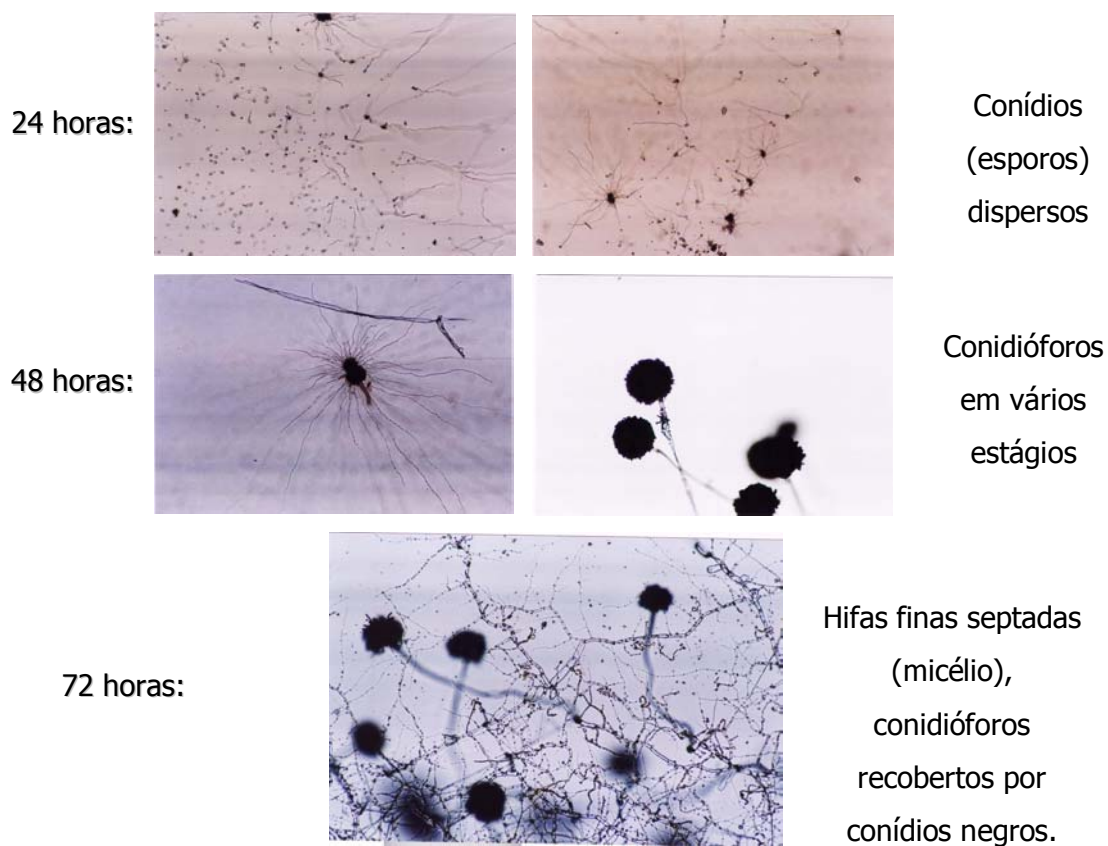


FIGURA 4. 6. Desenvolvimento de *Aspergillus niger* LPB 326 em relação ao tempo. Fotos em aumento de 100x.

#### 4.4. Caracterização dos substratos

A Tabela 4.3. apresenta a composição granulométrica dos substratos utilizados na FES neste trabalho. A análise granulométrica é um dos métodos utilizados para se efetuar a medida do tamanho de partículas simples ou sistemas de partículas. Consiste na determinação da distribuição de tamanhos de uma amostra de partículas (SOUZA et al., 2005).

TABELA 4. 3. Porcentagem granulométrica dos substratos

Mesh (abertura em mm)	Bagaço de cana, %	Farelo de soja, %
Mesh $\geq$ 7 (2,83 mm)	<b>38,9</b>	3,6
7 > mesh $\geq$ 10 (2 mm)	12,6	21,2
10 > mesh $\geq$ 14 (1,41 mm)	4,2	22,4
14 > mesh $\geq$ 20 (0,84 mm)	5,5	17,5
20 > mesh $\geq$ 35 (0,5 mm)	25,7	<b>25,2</b>
Mesh < 35 (0,5 mm)	13,1	10,1

Verificar a composição granulométrica dos substratos foi de grande utilidade para as análises, visto que desta forma foi possível obter uma estimativa mais precisa de substratos provenientes da agroindústria e que são extremamente heterogêneos. Pôde-se observar que as amostras pesadas e colocadas nos frascos para fermentação neste trabalho contêm uma maior porcentagem de bagaço de cana numa granulometria grande (2,83 mm ou mesh $\geq$ 7) e a maior quantidade de farelo de soja num mesh entre 20 e 35 (0,84 - 0,5 mm).

Os dados obtidos a partir da caracterização físico-química dos substratos utilizados neste trabalho (bagaço de cana e farelo de soja) estão apresentados na Tabela 4.4.



TABELA 4. 4. Características físico-químicas do Bagaço de cana e Farelo de soja

Parâmetros	Bagaço de cana	Farelo de Soja
Cinzas (%)	3.71±0.28	5.06±0.04
Umidade (%)	10.75±0.22	12.55±0.33
Proteína bruta (%)	1.18±0.10	43.10±1.13
Açúcares totais (%)	12.9±0.14	35.4±0.7

De acordo com a Portaria nº 795 de 15/12/93, este farelo de soja pode ser classificado como farelo de soja cru pertencente ao tipo 3, onde o conteúdo máximo de umidade é de 12,5%, o conteúdo mínimo de proteína é de 44% e com teor máximo de cinzas de 6,5%. Os teores de cinzas e proteína bruta caracterizados para o bagaço de cana encontram-se abaixo daqueles descritos por MELLO JUNIOR et al., 1989, onde a proteína bruta ficou em torno de 1,5% e cinzas em 4,5%; no entanto o teor de cinzas avaliado neste trabalho ficou acima do valor de 1,3% encontrado por SOUZA et al., 2005.

Os resultados de produção de xilanase apresentaram uma grande variação com as proporções de substratos estudadas, numa faixa de 23-1863 UI/g (Figura 4.7). O menor valor de atividade enzimática foi obtido quando apenas bagaço de cana de açúcar (100%) foi utilizado para a fermentação, e o valor mais alto foi alcançado com uma mistura de 65% de bagaço de cana e 35% de farelo de soja (mantendo assim uma relação carbono:nitrogênio de 2:1). Estes resultados mostram que provavelmente a quantidade de nitrogênio presente no bagaço de cana seja muito pequena para suportar um bom crescimento e produção enzimática e, portanto, que a fonte de nitrogênio e sua quantidade afetam a produção de xilanase, assim como também foi observado por PARK et al. (2002), trabalhando com palha de arroz.

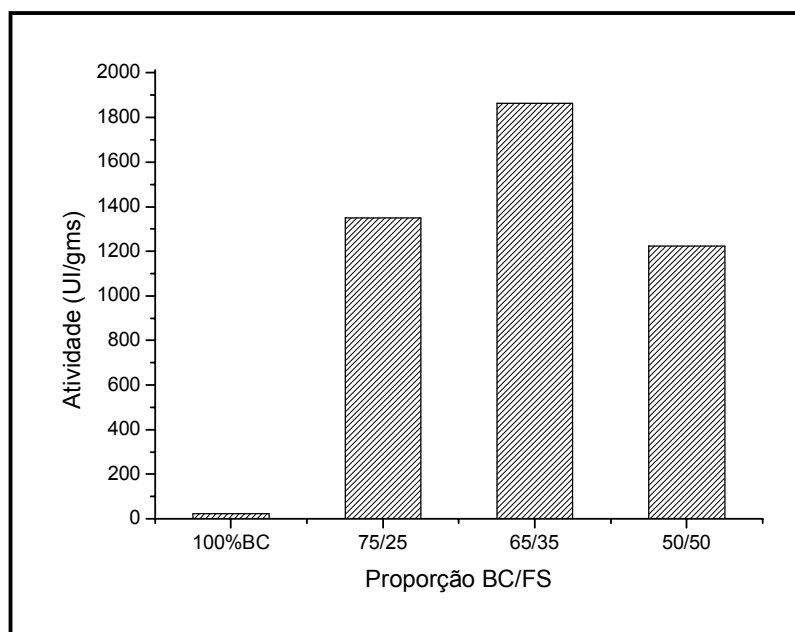


FIGURA 4. 7. Influência da proporção dos substratos (BC – bagaço de cana e FS – farelo de soja) na produção de xilanase (UI/g de matéria seca).

De acordo com os resultados obtidos, a razão BC/FS escolhida para os estudos de otimização foi 65/35%, respectivamente.

O teste de absorção de água mostrou que a capacidade máxima de retenção de líquido (sem água livre) para a razão escolhida foi de 85%. A partir deste teste foi possível determinar que existe um nível máximo de água que pode ser adicionado ao substrato sólido de forma a manter a fermentação com características de FES, e pelos dados calculados de níveis máximos de absorção de água foi possível que nas fermentações não houvesse água livre.

#### 4.5. Extração da hemicelulose/xilana do bagaço de cana

A partir de 15 g de bagaço de cana, foram obtidos 7,29 g de hemicelulose/xilana, apresentando um rendimento de 48,66%. Neste estudo, foi utilizado o protocolo proposto por DE LOPEZ et al., 1996, onde atingiu-se um rendimento maior correspondente a 56,90%, que pode ser justificado pelo uso de uma espécie vegetal diferente, no caso, a palha de cevada. A hemicelulose/xilana extraída pôde ser testada em meios qualitativos para seleção de cepas, além de poder auxiliar na estabilização da enzima produzida frente à temperatura.

#### 4.5.1. Teste qualitativo com xilana extraída do bagaço de cana

Ao estabelecermos o índice enzimático, ou seja, a razão halo consumo carbono/halo da colônia como parâmetro de produção de xilanase, levamos em conta a capacidade de crescimento da colônia frente à utilização da fonte única de carbono (xilana), e o tamanho do halo formado pela degradação da xilana ao redor da colônia. Ao observar a Tabela 4.5, pode-se notar uma relação constante entre as razões obtidas com os dois tipos de xilana testadas. A melhor concentração estudada para xilana BC foi de 0,5% (proporcionou um halo facilmente visível).

TABELA 4. 5. Índices enzimáticos dos testes em placa com xilana extraída do bagaço de cana (BC) e xilana padrão (Sigma).

Cepas	Índice enzimático Xilana BC 0,5%	Índice enzimático Xilana Padrão 0,2%
<i>A. niger</i> 326	1,34	1,63
<i>A. niger</i> 35	1,21	1,44

Em média, o resultado do índice enzimático com a xilana extraída foi menor (16,9%) do que com a xilana padrão; no entanto o resultado foi satisfatório para o uso proposto neste trabalho visto que a relação entre o tamanho do halo produzido por cada cepa foi mantida. Portanto, é possível utilizar a xilana extraída do bagaço de cana para estudos qualitativos.

## 4.6. Delineamentos experimentais

### 4.6.1. Otimização pH, temperatura e umidade

As figuras 4.8 e 4.10 mostram os gráficos de contorno da primeira otimização dos parâmetros físicos pH, temperatura e umidade da fermentação no estado sólido.

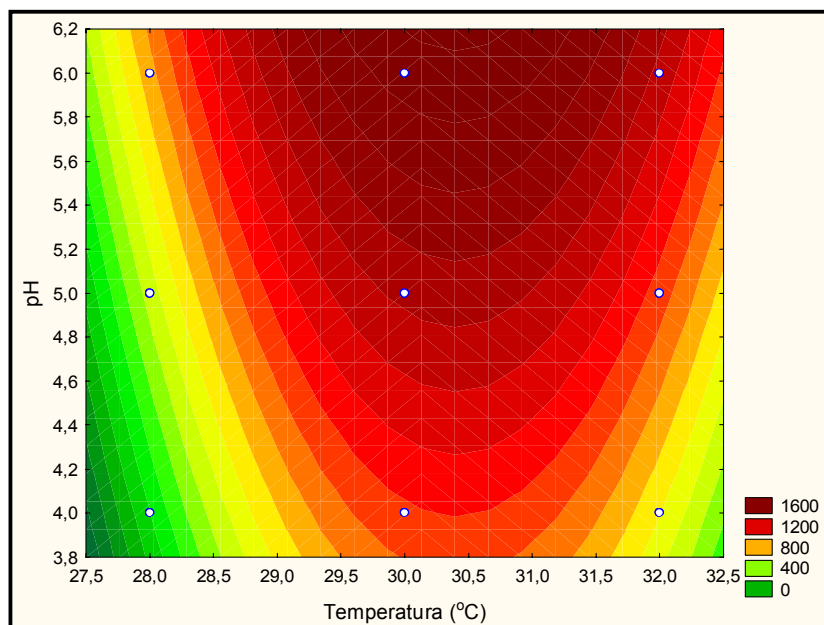


FIGURA 4. 8. Gráfico de contorno da otimização de pH e temperatura.

Neste trabalho, os níveis de pH estudados não mostraram efeito significativo na produção de xilanase com  $p \leq 0,05$ , o que pode ser visualizado na Figura 4.9. Para isso, um segundo estudo foi realizado (otimização pH e umidade).

A temperatura ficou numa região ótima em torno de 30°C (Figura 4.8), e desta forma, esta temperatura foi escolhida como a melhor para a produção de xilanase com *A. niger* LPB 326. Outros autores também encontraram o mesmo resultado em termos de condições de temperatura. SMITH e WOOD (2004) observaram que a melhor temperatura para produção de xilanases por uma cepa de *Aspergillus awamori* foi 30°C em cultivo líquido. Segundo PRASERTSAN et al. (1997), a temperatura ótima para produção de xilanases por fermentação no estado sólido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 6275 foi de 30°C.

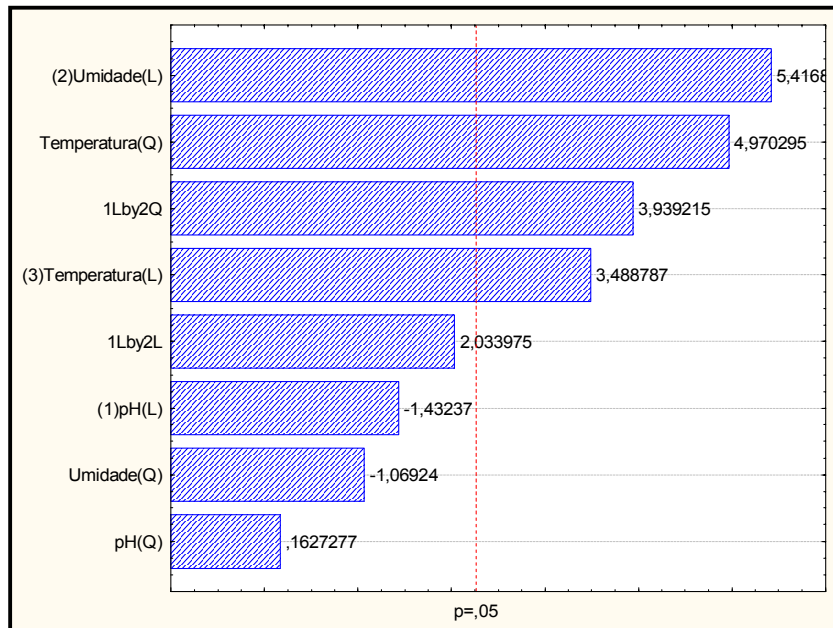


FIGURA 4. 9. Diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas com  $p \leq 0,05$ .

A umidade inicial do meio influenciou a produção de xilanase a qual mostrou uma tendência de aumento com o aumento no conteúdo de umidade, o que pode ser visualizado no gráfico de contorno da Figura 4.10.

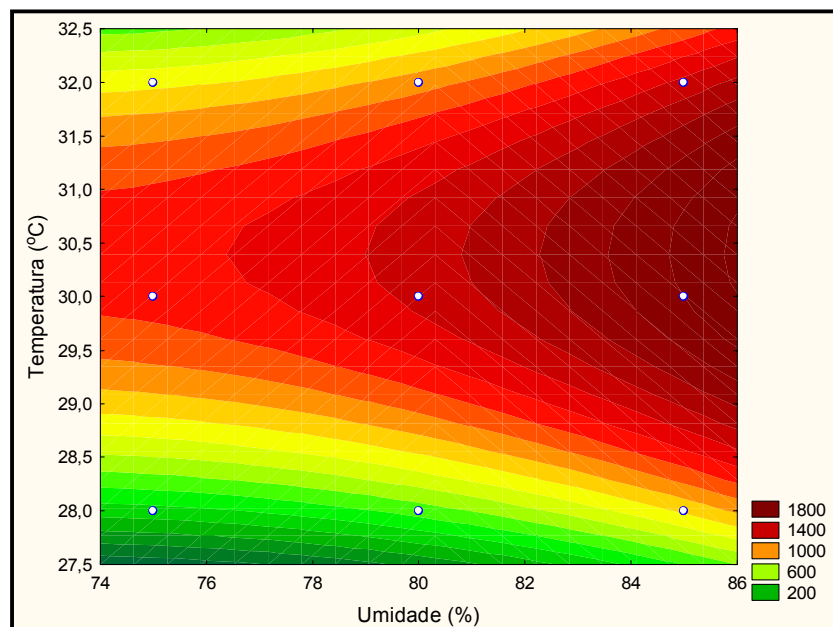


FIGURA 4. 10. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade e temperatura.

Entretanto, a umidade inicial não pôde ser considerada em valores acima de 85%, devido ao limite de retenção de água dos substratos (item 4.5). Para se confirmar este resultado, outros níveis de umidade (faixa mais estreita, dentro do conteúdo de umidade máximo possível) foram utilizados em um segundo estudo de otimização. A atividade de xilanase máxima obtida durante os experimentos desta primeira otimização foi de 1.992 UI/g de matéria seca.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função de resposta com os dados experimentais. A Tabela 4.6 mostra a análise de variância dos fatores estudados (pH, umidade e temperatura), os quais foram ajustados de acordo com o modelo quadrático com duas interações (linear, quadrático).

A significância da falta de ajuste, erro puro e do modelo foram utilizadas para se avaliar a adequação do ajuste do modelo. O teste F da análise de variância mostrou que o modelo utilizado (quadrático de segunda ordem) ajustou bem os dados experimentais.

TABELA 4. 6. Análise de variância das respostas de pH, umidade e temperatura.

Fatores		SS	df	MS	F	p
pH	L+Q	66177	2	33088,5	1,03908	0,392634
Umidade	L+Q	970796	2	485398,1	15,24293	0,001289 #
Temperatura	L+Q	1174268	2	587134,2	18,43774	0,000656 #
	1*2	625880	2	312940,0	9,82724	0,005454 #
	Puro erro	286597	9	31844,2		
	SS Total	2775496	17			

# Variáveis significativas com  $p \leq 0,05$ .

A significância da equação obtida a partir do modelo de segunda ordem foi avaliada, e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi 0,90, indicando que 90% da variabilidade na resposta pôde ser explicado pelo modelo. A equação de resposta obtida para os parâmetros estudados está na Tabela 4.7.

TABELA 4. 7. Equação de regressão para as variáveis significativas temperatura e umidade.

$y=668084,53 -20216,97*x_1 + 125,57*x_1^2$	Umidade ( $x_1$ )
$+9534,56*x_2-156,79*x_2^2+3932,44*5*x_1$	Temperatura ( $x_2$ )
$-24,35*5*x_1^2-791724,34$	

Coefficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,90.

Existem alguns efeitos redundantes (efeitos de combinações lineares de outros efeitos) que não puderam ser estimados pelo modelo escolhido, o qual ofereceu o melhor ajuste.

#### 4.6.2. Otimização pH e umidade (segundo estudo)

O delineamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  e os resultados de atividade de xilanase obtidos neste segundo estudo de otimização estão presentes na Tabela 4.8.

A temperatura utilizada durante a fermentação foi a otimizada anteriormente, 30°C. Novamente os níveis de pH estudados não mostraram efeitos significativos com  $p \leq 0,05$  (Figura 4.11); entretanto, o pH natural dos substratos utilizados (BC + FS) que fica em torno de 6,0 (sem ajuste ou tamponamento) demonstrou ser adequado para o desenvolvimento do fungo e produção de xilanase em estudos posteriores, suprimindo a necessidade de ajuste inicial de pH.

Os níveis de umidade avaliados não chegaram a uma resposta ótima, confirmando o estudo realizado anteriormente (primeira otimização) de que o aumento na proporção de umidade inicial (acima da capacidade máxima) poderia aumentar a atividade de xilanase (Figura 4.10). Este resultado também foi obtido nos estudos realizados por SOUZA *et al.* (1999), onde a umidade inicial e a concentração de bagaço foram os efeitos mais importantes na produção de xilanase.

TABELA 4. 8. Níveis de pH e umidade e atividades de xilanase

Experimentos	pH ( $X_1$ )	Umidade (% $X_2$ )	Atividade (UI/g)
1	4	79	1.267
2	4	82	1.699
3	<b>4</b>	<b>85</b>	<b>1.843</b>
4	4.5	79	1.303
5	4.5	82	1.587
6	4.5	85	1.797
7	5	79	1.493
8	5	82	1.605
9	5	85	1.720
10	4	79	1.296
11	4	82	1.669
12	<b>4</b>	<b>85</b>	<b>1.947</b>
13	4.5	79	1.353
14	4.5	82	1.633
15	4.5	85	1.756
16	5	79	1.320
17	5	82	1.712
18	5	85	1.743

A importância crítica do nível de umidade em FES e sua influência na biossíntese e liberação de enzimas pode ser atribuída à interferência da umidade nas propriedades físicas das partículas sólidas. Um aumento no nível de umidade não deve embeber o substrato deixando água livre, podendo reduzir a porosidade de alguns substratos, e assim limitando a transferência de oxigênio. Por outro lado, um conteúdo baixo de umidade causaria a redução da solubilidade dos nutrientes do substrato e baixo grau de turgescência (ELLIAH et al., 2002). Desta forma, estudos de otimização deste parâmetro são bastante relevantes em FES.



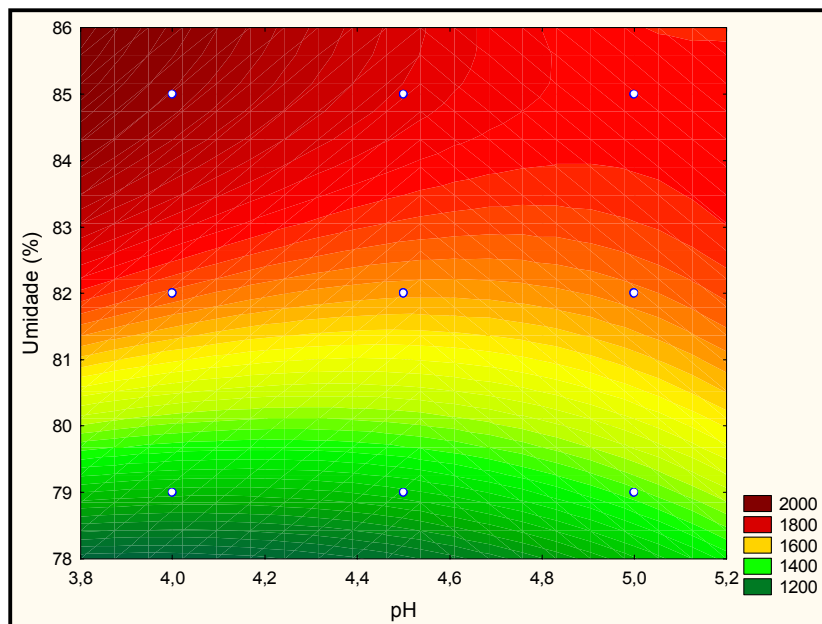


FIGURA 4. 11. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas para os valores de pH e umidade na produção de xilanase.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função de resposta com os dados experimentais. A Tabela 4.9 mostra a análise de variância dos fatores pH e umidade, ajustados de acordo com o modelo quadrático com duas interações (linear x linear). A significância da falta de ajuste, do erro e do modelo foram utilizadas para avaliar se o modelo proporcionou um ajuste satisfatório. O teste F (análise de variância) mostrou que o modelo utilizado ajustou adequadamente os dados experimentais. O coeficiente de determinação obtido para o modelo quadrático foi de 0,96. A máxima atividade de xilanase obtida neste estudo foi de 1.947 UI/gms.

TABELA 4.9. Análise de variância das respostas de pH e umidade.

	SS	df	MS	F	<i>p</i>
pH L+Q	7067,8	2	3533,9	1,04035	0,392228
Umidade L+Q	668165,7	2	334082,8	98,35187	0,000001#
pH*umidade	41659,6	1	41659,6	12,26432	0,006702#
Falta de ajuste	1372,4	3	457,5	0,13468	0,936888
Erro puro	30571,3	9	3396,8		
SS total	748836,8	17			

#  $p \leq 0.05$ . Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) = 0.96

#### 4.6.3. Otimização da extração da enzima

##### 4.6.3.1. Efeito da escolha do solvente no processo de extração

Os resultados obtidos em termos de atividade enzimática a partir da utilização de diferentes solventes para extração de xilanase podem ser observados na Tabela 4.10. A extração com a solução composta de água deionizada + Tween 80 (0,1%) + NaCl (0,9%) continuou sendo a mais efetiva na recuperação de xilanase (2.160 UI/gms). O tampão citrato de sódio (pH 5,3) foi a segunda solução mais eficiente, apresentando, no entanto, uma redução de 28% na recuperação enzimática (de xilanasas) em relação a melhor solução. O tratamento com a menor eficiência foi obtido com a utilização do tampão acetato de sódio pH 5,0 (1.145 UI/gms).

TABELA 4.10. Resultados da aplicação de diferentes solventes na extração enzimática.

Tratamento	Atividade (UI/gms)
Tampão acetato	1.145
Tampão citrato	1.555
T80+H <sub>2</sub> O	1.257
T80+NaCl+H <sub>2</sub> O	2.160
H <sub>2</sub> O	1.436
H <sub>2</sub> O centrifugação	1.658

T80 – Tween 80; H<sub>2</sub>O – água deionizada

A centrifugação do extrato bruto mostrou-se eficiente realizando uma separação maior da enzima de outros componentes do extrato bruto, o que ficou evidente no aumento de 15% na atividade enzimática em relação à amostra não centrifugada.

De acordo com SINGH et al., 1999, o solvente ideal deve extrair a enzima seletivamente e completamente à temperatura ambiente, com um tempo mínimo de contato e, preferencialmente, no pH do substrato cultivado. A eficiência de um solvente em extrair a enzima de um substrato fermentado depende principalmente de três fatores: tipo da enzima, fonte da enzima e substrato utilizado como meio

de cultivo (QADEER et al., 1980; RAMAKRISHNA et al., 1982). Além disso, a maior ou menor recuperação das enzimas de um meio de cultura está envolvida com o fato de estas estarem ligadas, em graus variáveis, com o substrato. Desta forma, uma solução composta por um tampão ou um agente surfactante facilitaria esta separação (RUEGGER, 2001). Surfactantes, como o Tween 80, podem aumentar a permeabilidade celular, facilitando a liberação de diversas moléculas através da membrana celular (SILVA et al., 2005). Alguns autores observaram que o Tween 80 (0,1%) foi o melhor solvente para extração de xilanase (REZENDE et al., 2002; DIAZ et al., 2005).

Nos estudos realizados por FADEL (2001), uma solução de NaCl (0,3M) foi mais eficiente que outros solventes testados na extração de xilanase, onde observou-se um aumento de 16% na atividade enzimática em comparação com tampões citrato e acetato. O aumento no rendimento da recuperação de xilanase utilizando NaCl no solvente sugere que a enzima estava ligada à superfície micelial por ligações iônicas e poderia ser liberada por compostos iônicos tais como o NaCl no meio (RAO et al., 1983; FADEL AND ABD-EL KADER, 1994; FADEL, 2001).

#### 4.6.3.2. Delineamento experimental para extração

Em um primeiro estudo foram escolhidas as condições próximas das utilizadas na extração padrão (30 mL de solvente com agitação em shaker a 120 rpm por 5 minutos) para a definição dos parâmetros e níveis a serem estudados, os quais estão presentes na Tabela 4.11.

Neste primeiro estudo, os fatores volume de solvente (linear) e tempo de extração (linear e quadrático) foram significativos com  $p \leq 0,05$  (Figura 4.12). A região ótima para o tempo de extração ficou definida entre 2 e 5 minutos. Uma tendência de aumento na recuperação da enzima foi observada juntamente com o aumento no volume de solução de extração a ser utilizada (Figura 4.13), com a agitação fixa em 120 rpm.

TABELA 4.11. Níveis e fatores estudados para otimização dos parâmetros de extração da xilanase, apresentando as atividades enzimáticas correspondentes à recuperação.

Experimentos	Volume de solução (mL)	Tempo (min)	Atividade (UI/gms)
1	20	2,5	894
2	20	5	1.015
3	20	7,5	750
4	30	2,5	1.433
5	30	5	1.585
6	30	7,5	1.118
7	<b>40</b>	<b>2,5</b>	<b>1.935</b>
8	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>2.327</b>
9	40	7,5	1.293
1	20	2,5	1.059
2	20	5	1.007
3	20	7,5	697
4	30	2,5	1.511
5	30	5	1.475
6	30	7,5	1.203
7	<b>40</b>	<b>2,5</b>	<b>2.258</b>
8	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>1.902</b>
9	40	7,5	1.268

Os dados foram ajustados a um modelo quadrático, com interações lineares (linear x linear). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado foi de 0,93 (com R ajustado de 0,90). A equação de resposta obtida é a seguinte:  $y = -1460,39 + 86,72 \cdot V - 0,20 \cdot V^2 + 504,0 \cdot T - 42,70 \cdot T^2 - 5,63 \cdot V \cdot T$ , onde V = valor codificado para volume e T = valor codificado para tempo. A atividade máxima de xilanase observada foi de 2.327 UI/gms (com 40 mL de solvente e 5 minutos de agitação à 120 rpm).

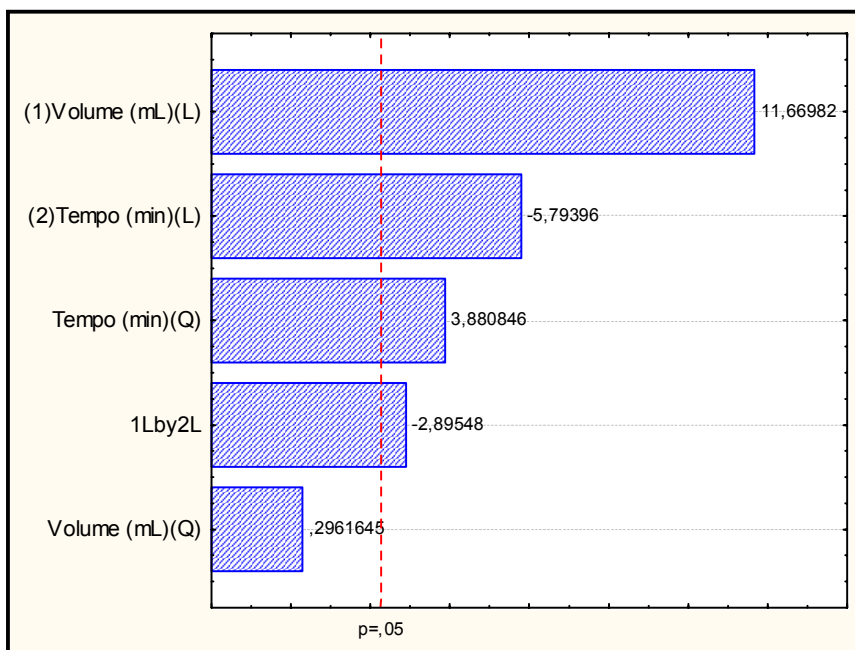


FIGURA 4. 12. Diagrama de Pareto mostrando os fatores que foram significativos neste primeiro de estudo de otimização de extração.

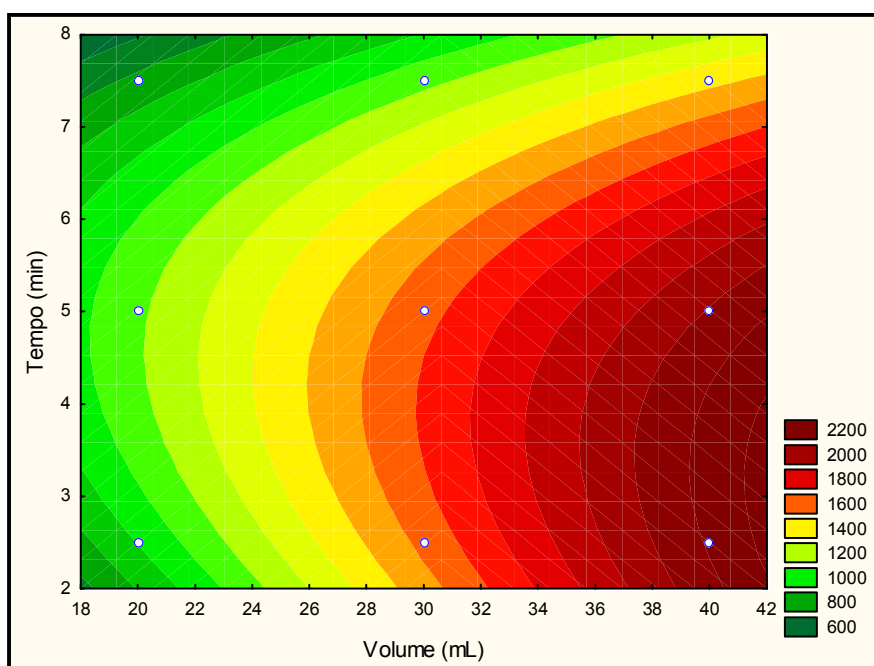


FIGURA 4.13. Gráfico de contorno dos parâmetros tempo (minutos) e volume de solução de extração (mL).

Os valores reais utilizados para o segundo delineamento experimental escolhido para otimização dos parâmetros de extração da enzima estão presentes na Tabela 4.12, onde também estão indicados os valores de atividade enzimática obtidos em cada experimento.

Nesta segunda avaliação do processo de extração, os níveis estudados para o tempo de extração foram aumentados em relação aos níveis do estudo anterior para se avaliar um possível efeito positivo ou aumento da extração da enzima. Os níveis para o volume de solvente foram mantidos (considerando que a enzima ficaria menos concentrada com um volume ainda maior de solução, e também pela economia de solvente num processo industrial). O parâmetro agitação (rpm) foi incluído neste estudo com o objetivo de melhorar a homogeneização do substrato sólido com o líquido de extração e aumentar a liberação de enzima ligada ao substrato.

TABELA 4.12. Valores utilizados para o experimento de otimização da extração de xilanase e as atividades enzimáticas correspondentes.

Experimentos	Tempo (min)	Agitação (rpm)	Volume solução (mL)	Atividade (UI/gms)
1	10	100	20	1.128
2	10	120	40	1.905
3	10	140	30	1.931
4	30	100	40	1.546
5	30	120	30	1.698
6	30	140	20	1.146
7	50	100	30	1.469
8	50	120	20	1.530
9	<b>50</b>	<b>140</b>	<b>40</b>	<b>2.133</b>
1	10	100	20	1.120
2	10	120	40	1.984
3	10	140	30	2.080
4	30	100	40	1.436
5	30	120	30	1.843
6	30	140	20	1.139
7	50	100	30	1.577
8	50	120	20	1.258
9	<b>50</b>	<b>140</b>	<b>40</b>	<b>2.084</b>

A Figura 4.14 mostra que todos os parâmetros avaliados neste experimento (segunda avaliação do processo de extração) foram significativos, exceto o tempo (linear), com  $p \leq 0,05$ .

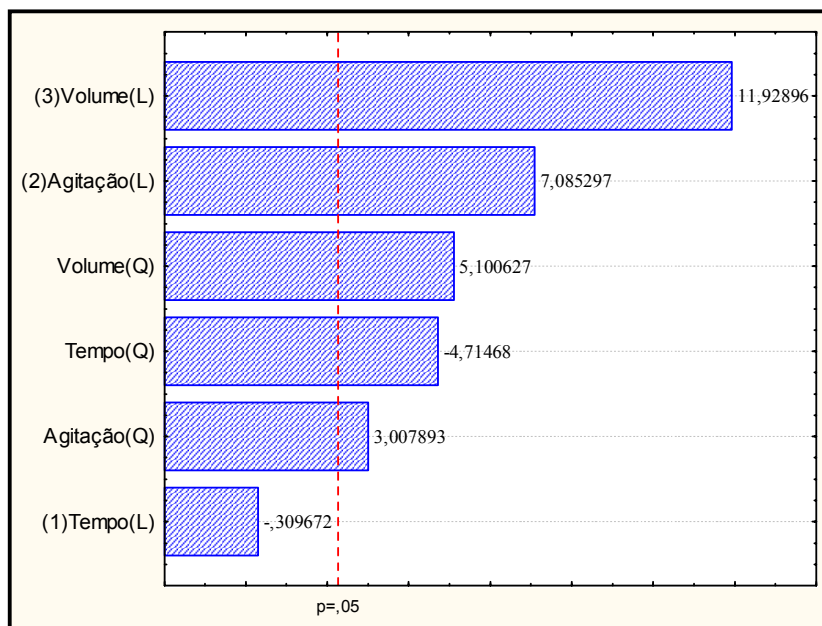


FIGURA 4. 14. Gráfico mostrando as variáveis significativas em  $p \leq 0,05$ .

Como pode ser observado na Figura 4.15, a região ótima para volume de solvente ficou delineada entre 30 e 42 mL e para agitação entre 120 e 145 rpm.

A agitação foi significativa, pois, através de uma alta frequência, a solução pode impregnar rapidamente todo o fermentado, garantindo um transporte eficiente das partículas aderidas ao sólido até a solubilização no líquido. Isso diminui o tempo necessário para a extração bem como a energia gasta no processo.

Apesar do fator tempo (quadrático) ter sido significativo, os níveis estudados para tempo de extração não foram adequados. As regiões ótimas no gráfico de contorno ficaram abaixo de 10 minutos ou acima de 50 minutos (Figura 4.16). Portanto, o tempo de extração ficou definido de acordo com o primeiro experimento, permanecendo 5 minutos como o melhor tempo de extração. Além disso, a Figura 4.14 mostrou que a variável tempo de extração poderia ser reduzida para uma melhor recuperação enzimática.

De acordo com GHILDYAL et al. (1991), longos períodos de tempo poderiam causar perdas de atividade enzimática devido à agitação mecânica prolongada ou à maior extração de agentes desnaturantes (incluindo exposição à

ação de proteases). REZENDE et al. (2002) observou que o tempo de extração (15, 30 e 60 minutos) não influenciou na recuperação de enzima adsorvida a partir do meio sólido.

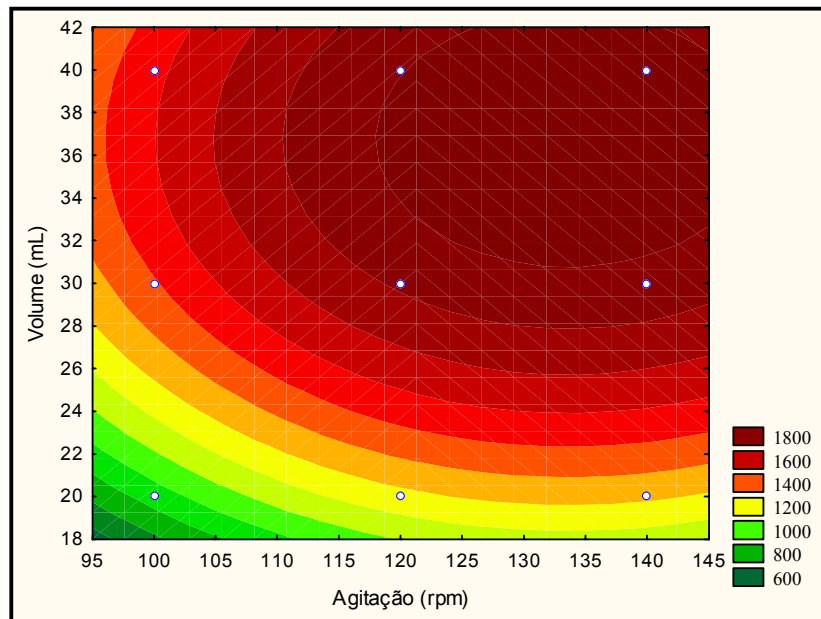


FIGURA 4. 15. Gráfico de contorno Volume x Agitação.

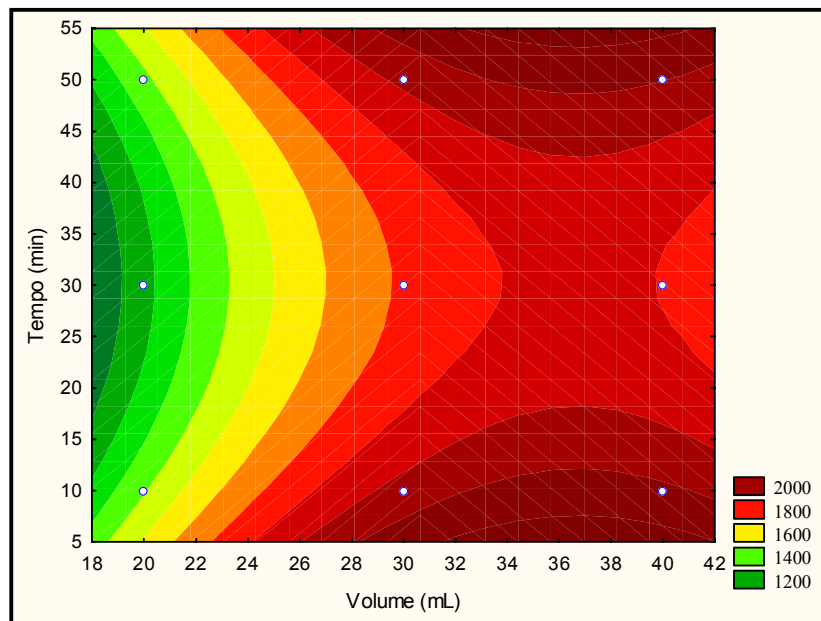


FIGURA 4. 16. Gráfico de contorno mostrando as regiões ótimas das variáveis tempo e volume.

Os parâmetros estatísticos da falta de ajuste, do erro puro e teste F foram utilizados para avaliar se o modelo proporcionou um ajuste satisfatório. Os dados



foram ajustados a um modelo de segunda ordem sem interações. A análise de variância mostrou que a falta de ajuste do modelo obtido não foi significativa, o que torna válido o uso do mesmo. O teste F (análise de variância) mostrou que o modelo utilizado ajustou adequadamente os dados experimentais. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo quadrático foi de 0,94 (R ajustado de 0,90), indicando que 94% da variabilidade na resposta pôde ser explicada pelo modelo.

A equação de resposta obtida para os dados de agitação e volume é a seguinte:  $y = -6875,33 + 91,55A - 0,34A^2 + 170,83V - 2,32V^2 - 495,58$ , onde A = valor codificado para agitação, V = valor codificado para volume.

A atividade máxima de xilanase neste segundo experimento foi de 2.133 UI/gms (40 mL de solvente e 140 rpm de agitação). Esta atividade foi menor que a máxima atingida no experimento anterior provavelmente devido ao tempo de extração. Os valores ótimos para os parâmetros estudados ficaram definidos em: 37 mL de solvente, 133 rpm para agitação (valores críticos obtidos pelo software STATISTICA) e cinco minutos para tempo de extração, de acordo com ambos os experimentos.

REZENDE et al. (2002) notou que quando o volume de extração foi aumentado duas, três, quatro e seis vezes em relação à uma extração inicial utilizando 15 mL, obteve-se uma menor atividade de xilanase por mL. No entanto, uma quantidade maior de enzima (unidades totais) foi recuperada quando o volume foi aumentado. Portanto, mais enzima pode ser solubilizada com um volume maior de solvente. Porém, a diluição aumenta e as unidades enzimáticas por mL diminuem (o efeito oposto ocorre com unidades totais enzimáticas, ou UI/gms), como pode ser visto nas Figuras 4.17 e 4.18.

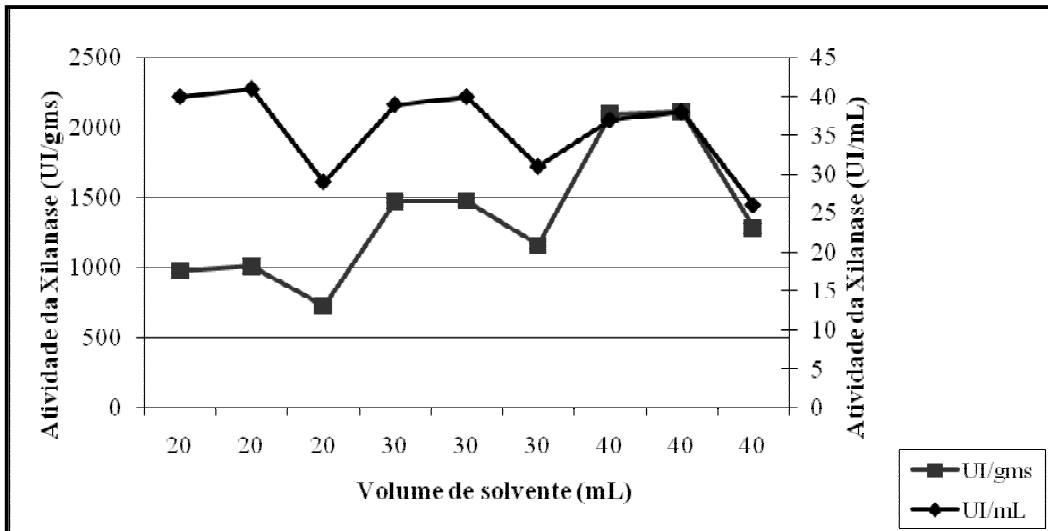


FIGURA 4. 17. Médias dos dados obtidos do primeiro estudo de otimização da extração mostrando atividades da xilanase em UI/mL (volumétrico) e UI/gms (unidades totais).

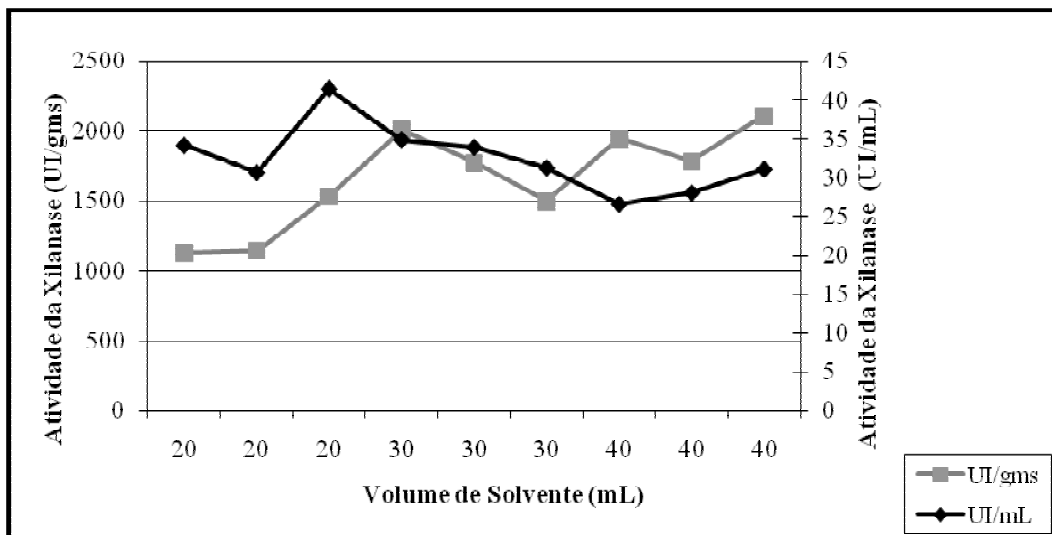


FIGURA 4. 18. Médias dos dados obtidos do segundo estudo de otimização da extração mostrando atividades da xilanase em UI/mL (volumétrico) e UI/gms (unidades totais).

#### 4.6.4. Efeito da composição química (solução mineral) e concentração de sais

A composição química baseada na presença ou ausência de alguns sais influenciou bastante a produção de xilanase, apresentando grandes variações de

atividades enzimáticas, com atividades de xilanase desde 1.779 UI/gms chegando a níveis acima de 3.000 UI/gms.

Os sais mostraram exercer uma ação ligada ao metabolismo do microrganismo, induzindo ou inibindo a produção da enzima (ANGELO, 1995). A composição do meio pode exercer uma função indutora na produção enzimática, e o que pode ser indutor para um microrganismo pode ser inibidor para outro (KULKARNI et al., 1999). A análise estatística foi efetuada para se identificar quais as variáveis (fatores) do meio que exerceram um efeito significativo, tanto positivo quanto negativo (30), na produção de xilanase. Na Figura 4.19 (gráfico de pareto), são indicados os sais com ação significativa na atividade de xilanase com  $p \leq 0,05$ , apresentando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,94.

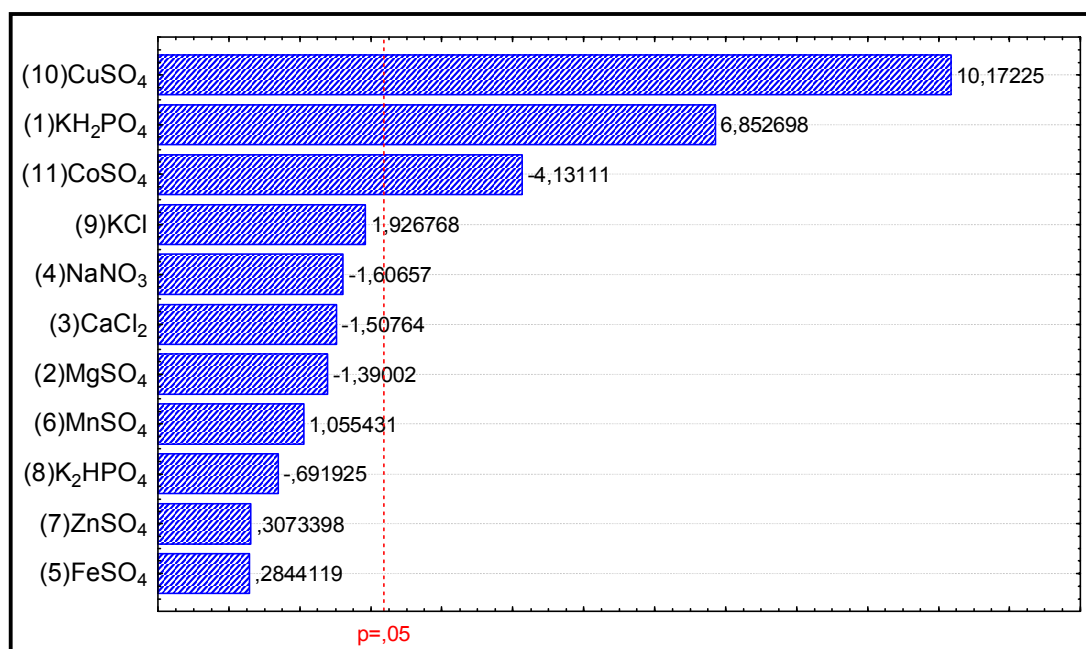


FIGURA 4. 19. Gráfico de pareto dos efeitos padronizados para os diferentes sais, mostrando a faixa de 95% de significância ( $p \leq 0,05$ ) na produção de xilanase.

Três sais (CuSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and CoSO<sub>4</sub>) foram selecionados para a otimização da concentração (sais significativos). PARK et al., utilizando palha de arroz como substrato em FES, com uma linhagem mutante de *A. niger*, empregou os mesmos sais selecionados neste trabalho na composição de seu meio de cultivo, além de líquido de maceração de milho e extrato de levedura industrial. Esses autores observaram que o nível de concentração do meio basal afetou fortemente a produção de xilanase.

As concentrações de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{CoSO}_4$ , as quais melhor estimularam a produção de xilanase (3,004 UI/g de matéria seca) foram 0.4 g/L, 1.5 g/L e 0.0012 g/L, respectivamente. Os valores otimizados para cada sal podem ser visualizados na Figura 4.20. Pode-se concluir que o substrato composto por bagaço de cana+farelo de soja supre boa parte dos oligoelementos necessários para o crescimento do fungo e síntese de xilanase, visto que dos 11 sais estudados somente três foram selecionados, com concentrações relativamente baixas. No entanto, a presença destes sais é essencial para a produção da enzima com o microrganismo e substratos empregados neste trabalho, o que é justificado pelo aumento significativo na produção da enzima.

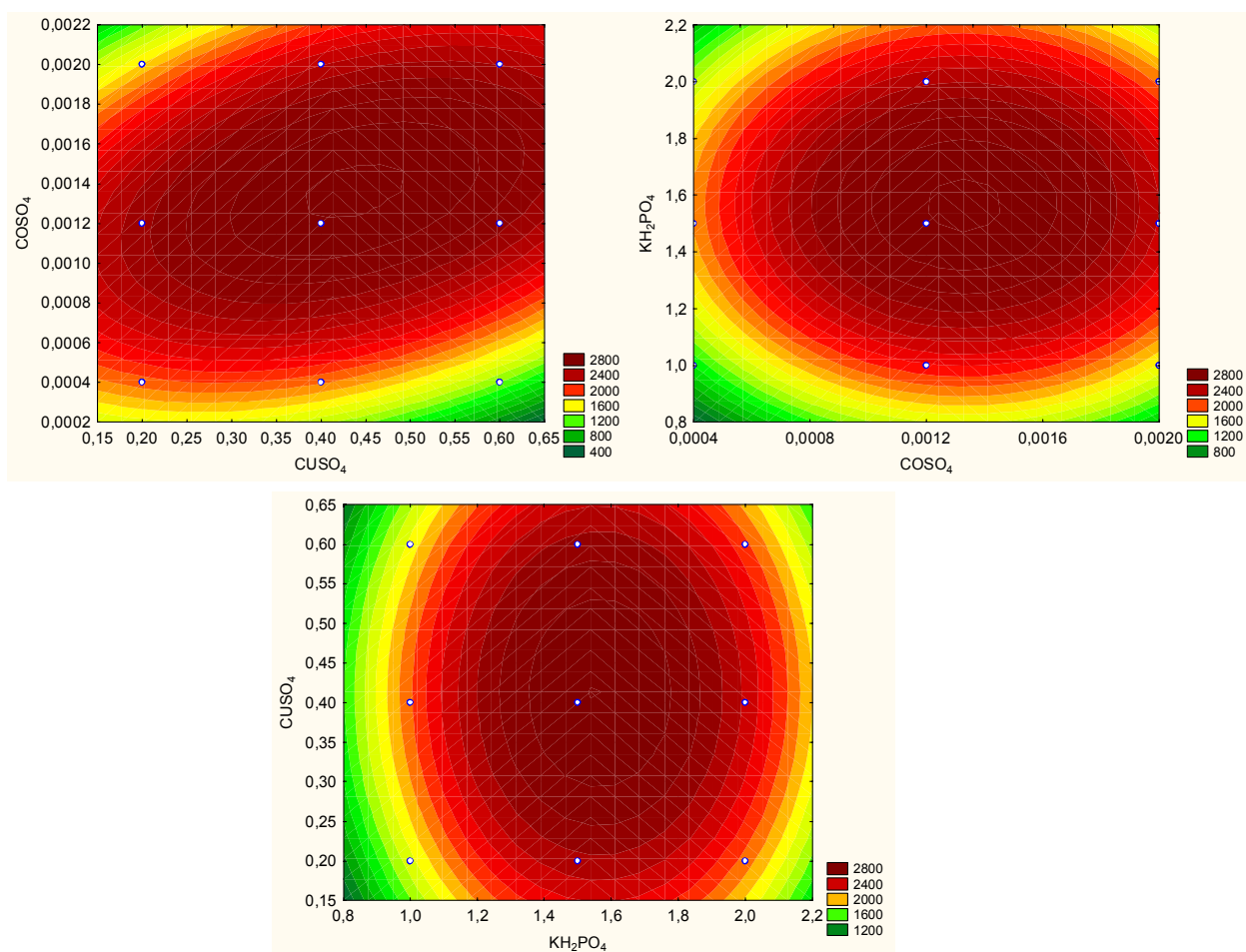


FIGURA 4. 20. Gráficos de contorno mostrando a região ótima para os sais (ponto central).

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo quadrático com duas interações lineares (linear x linear), chegando a um coeficiente de determinação

(R<sup>2</sup>) de 0,92. A equação de resposta obtida a partir dos efeitos de interação entre CuSO<sub>4</sub> e CoSO<sub>4</sub> pode ser visualizada na Tabela 4.13.

TABELA 4.13. Equação de regressão dos parâmetros representados pelas concentrações de CuSO<sub>4</sub> e CoSO<sub>4</sub>.

$y = -4843,71 + 3229,80 \cdot x_1 - 7206,17 \cdot x_1^2 + 2172749,70 \cdot x_2 -$	CuSO <sub>4</sub> (x <sub>1</sub> )
$1156478240,84 \cdot x_2^2 + 2255755,66 \cdot x_1 \cdot x_2 + 5472,53$	CoSO <sub>4</sub> (x <sub>2</sub> )

A análise de variância (ANOVA) foi efetuada para se avaliar a significância do modelo. Os dados estatísticos estão presentes na Tabela 4.14. Todas as concentrações de sais avaliadas foram significativas, com p ≤ 0,05.

TABELA 4.14. Análise estatística dos modelos de produção de xilanase em diferentes níveis de concentração de sais.

		SS	df	MS	F	p
(1)CUSO4	L+Q	346509	2	173254	5,28272	0,030366
(2)COSO4	L+Q	2880182	2	1440091	43,91001	0,000023
(3)KH2PO4	L+Q	882264	2	441132	13,45061	0,001977
	1*2	521056	1	521056	15,88758	0,003177
	Falta de ajuste	19278	1	19278	0,58779	0,462909
	Erro puro	295168	9	32796		
	SS total	4476229	17			

Coefficiente de determinação (R<sup>2</sup>=0,92)

Uma repetição do experimento nas melhores condições obtidas (otimização) foi realizada, alcançando uma produção de xilanase de 3,099 UI/g de matéria seca. As atividades de celulasas também foram analisadas resultando em 46 unidades/mL para o ensaio utilizando papel de filtro como substrato (FPU) e 37 unidades/mL para ensaio com carboximetilcelulose (CMC). Enquanto várias espécies de *Bacillus* sintetizam altos níveis de xilanase extracelular livres de celulase, os fungos filamentosos ao sintetizarem grandes quantidades de proteínas extracelulares, liberam celulasas concomitantemente às xilanases, o que ocorre, por exemplo, nas espécies de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (

Entretanto, a quantidade de celulase produzida pode ser controlada de acordo com a composição do meio (xilana pura induz a produção única de xilanase), a temperatura empregada, entre outros parâmetros fermentativos (GOMES et al., 1992; KULKARNI et al., 1999). Uma das aplicações industriais não praticáveis para preparações enzimáticas contendo celulase situa-se na indústria de papel e celulose. No entanto, várias outras aplicações são até mesmo beneficiadas com a presença de celulases, como no caso do setor de alimentação animal (SALEH et al., 2003; TAHIR et al., 2005).

A produção de xilanase por outros autores, utilizando cepas de *Aspergillus* (não mutantes) em FES, foi comparada com dados obtidos neste trabalho (maior atividade obtida durante o trabalho) na Tabela 4.15.

TABELA 4.15. Comparação da produção de xilanase em vários materiais lignocelulósicos em FES, com diferentes cepas de *Aspergillus*.

Microrganismo	Substrato	Umidade Inicial (%)	Condições de cultivo	Atividade Xilanase (UI/g)	Referências
<i>A. awamori</i>	BC	92	30°C, 60 horas	2.500	LEMOS et al., 2001
<i>A. fischeri</i>	FT	80	30°C, 3 dias	1.024	SENTHILKUMAR et al., 2005
<i>A. niger</i>	FT + PT	70	30°C, 4 dias	2.500	DESCHAMPS et al., 1985
<i>A. niger</i> LPB 326	BC+ FS	85	30°C, 4 dias	3.099	Neste trabalho
	FT + xilana	60	28°C, 14 dias	724	BISWAS et al., 1988.
<i>A. ochraceus</i>	PT	60	28°C, 14 dias	488	

BC = Bagaço de cana; FS = Farelo de soja; FT = Farelo de trigo; PT = Palha de trigo.

#### 4.7. Estudo da influência do pH inicial

De acordo com a Tabela 3.5, foram realizados 3 testes com diferentes condições de pH inicial, baseados nos resultados das otimizações desta variável. Na Tabela 4.16 são apresentados os resultados obtidos a partir dos testes com diferentes condições de ajuste (ou sem ajuste) de pH inicial.

TABELA 4.16. Resultados dos testes de ajuste de pH inicial

Testes	Atividade (UI/gms)
1	1.886
2	1.576
3	956

O valor de pH 4,0 foi escolhido devido a maior atividade enzimática obtida neste valor de pH durante a otimização.

Após duas otimizações indicando que o pH não é uma variável significativa para o processo, questionou-se o uso de uma condição natural de pH, o que permite uma simulação de um ambiente como o encontrado na natureza, promovendo uma melhor fermentação pelo fungo, além da economia de tempo e reagentes. Confirmando essa previsão, e de acordo com a Tabela 4.16, a fermentação conduzida sem correção do pH obteve um melhor resultado. O pH do substrato sem alterações ficou próximo de 6,0 e mostrou-se apropriado em comparação com os outros testes realizados.

#### 4.8. Efeito de alguns aditivos na produção da xilanase em FES

O efeito da adição de glicerol, sulfato de amônio e Tween-80 também foram estudados. O glicerol foi utilizado numa tentativa de aumentar a atividade de água do substrato e melhorar a produção, segundo trabalho de GRAJEK e GERVAIS (1987), citados por GERVAIS & MOLIN (2003), onde as maiores atividades da poligalacturonase foram obtidas em meios acrescidos de glicerol. Em relação ao Tween-80 (surfactante), ALAM et al., (1994) relatam que a suplementação com 0,1% de Tween-80 no substrato mostrou-se eficiente para o processo, auxiliando na liberação da enzima. A suplementação do meio de cultivo

com uma fonte inorgânica de nitrogênio foi baseada nos trabalhos de KALOGERIS et al. (1998), GHANEM et al. (2000) e BAKIR et al. (2001), onde a produção de xilanase aumentou com a presença desta fonte.

Somente o tratamento com Tween-80 teve efeito positivo sobre a produção de xilanase, aumentando em 6% (3.168 UI/g) a atividade enzimática em relação ao padrão (2.989 UI/g). O mecanismo que leva ao aumento de produção enzimática pelo Tween-80 pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade na membrana celular, permitindo uma secreção mais rápida de enzimas, o que leva a uma maior síntese enzimática (ARNESEN et al., 1998; ERIKSSON et al., 2002). Além disso, o Tween-80 poderia atuar na membrana celular facilitando a entrada de certos componentes do meio os quais seriam responsáveis pelo aumento na síntese de xilanase. Outra explicação possível é que o Tween-80 apresenta uma influência no nível da glicosilação e, portanto, na estabilidade protéica (KRUSZEWSKA et al., 1990).

#### 4.9. Estudo de secagem do material fermentado

Em um primeiro estudo de secagem, foram testadas diferentes temperaturas (com tempo de secagem menor para a maior temperatura), para se avaliar a presença de atividade xilanolítica no produto fermentado seco. Os dados da atividade residual estão apresentados na Figura 4.21. A secagem na temperatura de 42°C por 20 horas (em estufa) foi a mais satisfatória em comparação com os outros tratamentos, mantendo 58% de atividade de xilanase no material fermentado seco (com 30% de umidade residual). A condição de secagem na temperatura de 50°C (20 horas) resultou em uma redução de 66% na atividade enzimática, no entanto a umidade final foi menor (20%) que a observada em 42°C.



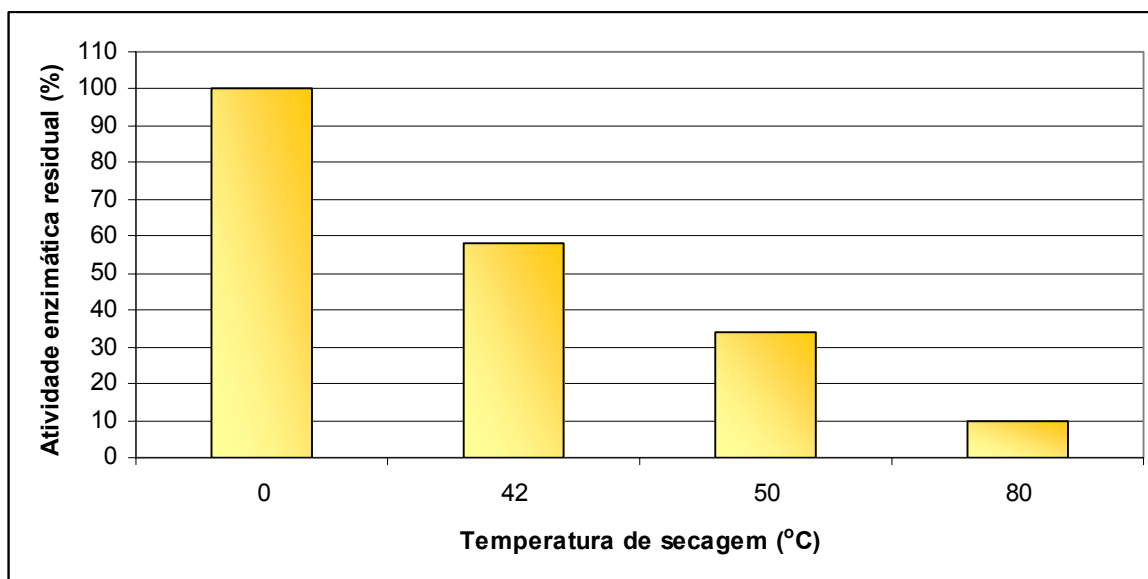


FIGURA 4. 21. Atividade enzimática residual após a secagem em diferentes temperaturas (42, 50 e 80°C). Atividade inicial (0) considerada 100%.

A temperatura de 80°C reduziu significativamente a atividade enzimática (atividade residual de 10%), ainda que por um período reduzido de tempo de secagem (1 hora).

O produto seco foi avaliado após 15 dias para se verificar a possível perda de atividade enzimática (Figura 4.22). As perdas foram mais reduzidas no produto obtido pelo tratamento à 42°C, em comparação com a secagem realizada à 50°C, correspondendo a 14% e 32%, respectivamente. Não foram observadas perdas de atividade no produto seco à 80°C, mas notou-se um pequeno aumento de atividade enzimática, o que pode estar relacionado à amostragem; no entanto, a atividade xilanolítica ainda manteve-se bastante reduzida em comparação com os outros tratamentos.

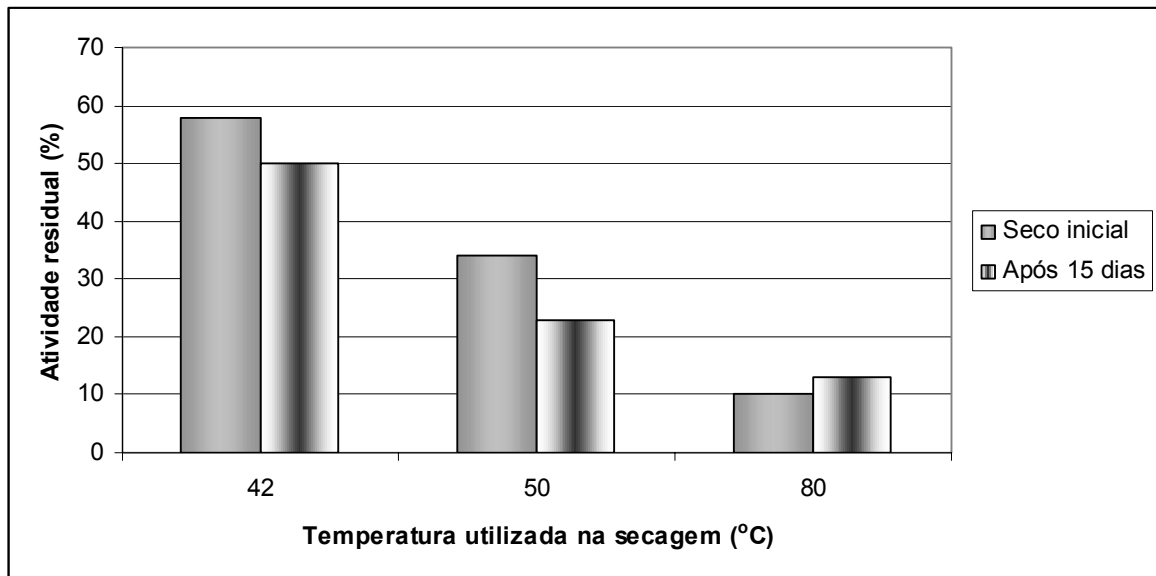


FIGURA 4. 22. Atividade enzimática residual do produto seco em diferentes temperaturas e após 15 dias, conservado em sacos plásticos em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ).

Em um segundo estudo, o substrato fermentado foi submetido à secagem em estufa nas temperaturas de  $50^{\circ}\text{C}$  por 6 horas (com o objetivo de reduzir a umidade para evitar o desenvolvimento fúngico) e à  $75\text{-}80^{\circ}\text{C}$  por 3 horas, na presença e ausência de solução de cloreto de cálcio (testar efeito estabilizante). O objetivo da secagem seria obter um produto que poderia ser utilizado e aplicado diretamente com a presença da xilanase, sem extração, onde o aditivo utilizado fosse seguro. Para este estudo foram utilizadas duas cepas: *Aspergillus niger* LPB 326 (obtida do cepário) e *Aspergillus niger* LPB BC (isolada do bagaço de cana). As Figuras 4.23 e 4.24 apresentam os dados das atividades enzimáticas iniciais (antes da secagem) e após a secagem nas diferentes temperaturas (com e sem cloreto de cálcio) para ambas as cepas.

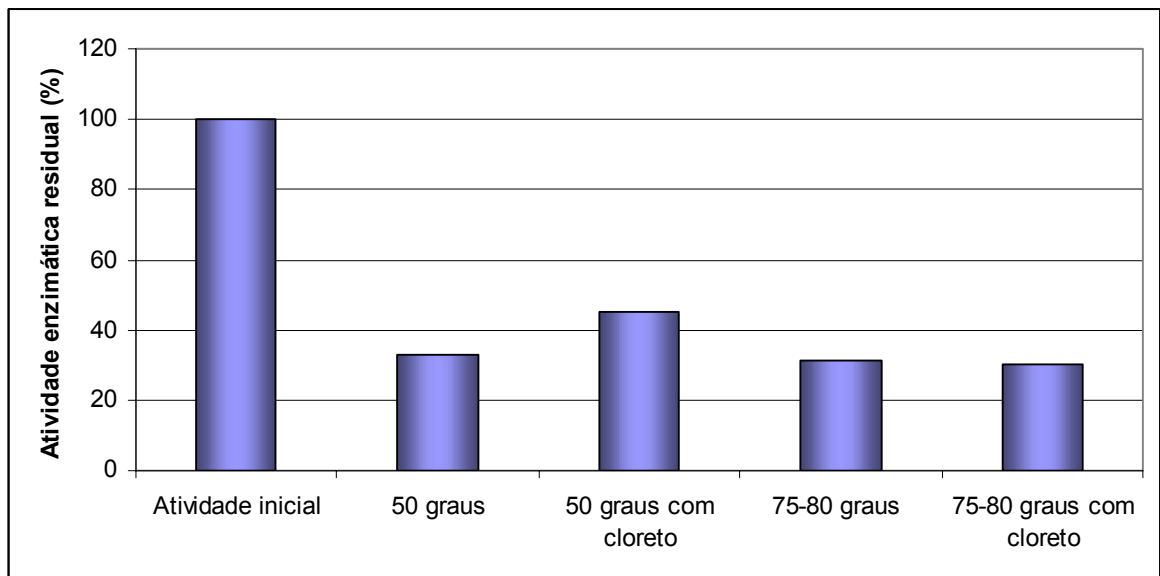


FIGURA 4. 23. Efeito da temperatura e da presença de cloreto de cálcio durante a secagem na atividade da xilanase produzida por *Aspergillus niger* BC.

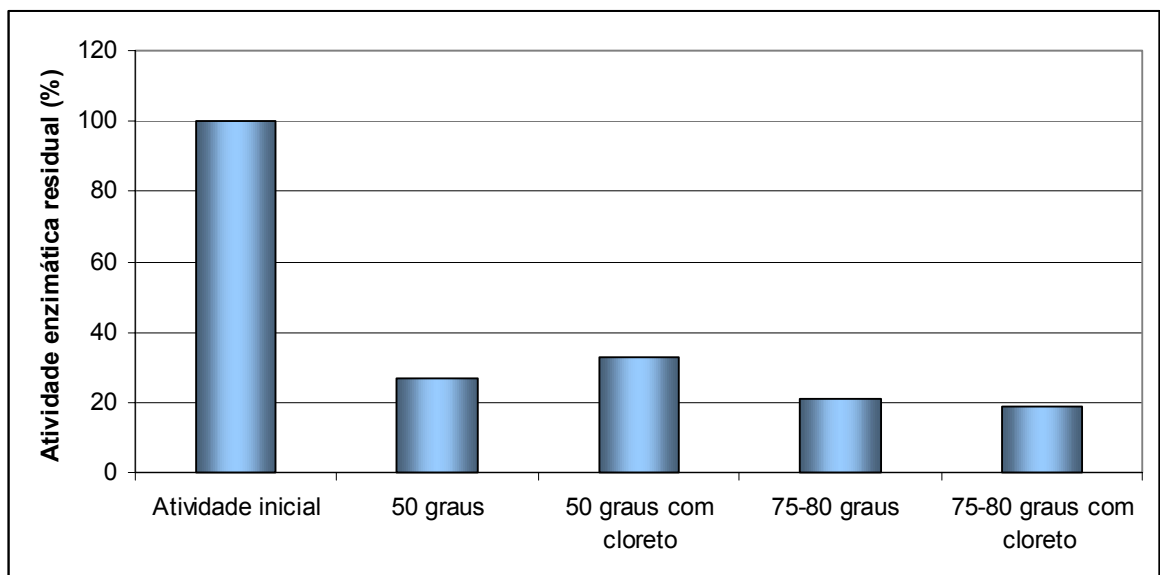


FIGURA 4. 24. Efeito da temperatura e da presença de cloreto de cálcio durante a secagem na atividade da xilanase produzida por *Aspergillus niger* 326.

A produção de xilanase por *A. niger* LPB 326 foi maior (atividade inicial maior) que por *A. niger* LPB BC, no entanto, na secagem realizada na temperatura de 75-80°C a xilanase produzida por *A. niger* LPB BC mostrou ser mais estável, apresentado resultados de atividade residual próximos dos obtidos na temperatura de 50°C.

Ambas as cepas apresentaram uma redução significativa da atividade xilanolítica após a secagem em relação à atividade inicial, provavelmente devido à

desnaturação da enzima durante o processo de perda de água e concentração. Essa redução foi mais expressiva para *A. niger* LPB 326. A atividade residual máxima mantida no material fermentado por *A. niger* LPB BC e *A. niger* LPB 326 foi de 45% e 33%, respectivamente, após a secagem à 50°C na presença de cloreto de cálcio. O cloreto de cálcio na concentração adicionada ao material submetido à secagem à 75-80°C praticamente não desempenhou qualquer efeito na atividade da xilanase para ambas as cepas. A umidade inicial de todas as fermentações foi de 80%, e a umidade residual média observada foi de 26 e 25% para tratamento realizado à 50°C e 25% e 22% para secagem à 75°C, correspondentes aos materiais fermentados por *A. niger* LPB 326 e LPB BC, respectivamente. A umidade final do material com cloreto de cálcio se manteve próxima ou igual ao material não-tratado.

#### 4.10. Propriedades do extrato bruto enzimático

##### 4.10.1. Caracterização enzimática

A temperatura e pH mostraram uma grande influência sobre a atividade das xilanases produzidas, como esperado. As atividades enzimáticas à 50°C mostraram ser maiores para todos os pH estudados (exceto pH 8). O estudo de caracterização mostrou que a maior atividade enzimática para xilanase (100%) foi obtida à 50°C e pH 5, como pode ser visualizado na Figura 4.25. A faixa de pH 5 – 6 foi considerada a melhor para as xilanases produzidas. Numa segunda avaliação esta faixa de pH foi estudada (5, 5,3, 5,5, 5,8 e 6) na melhor temperatura, de forma a se encontrar o pH ideal (Figura 4.26). As melhores atividades da xilanase produzida foram obtidas na faixa de pH de 5,3 a 5,8. Desta forma, manteve-se a temperatura de 50°C e pH 5,3 como as melhores condições de análise. Geralmente as xilanases ácidas possuem uma faixa de temperatura ótima de 50 a 60°C e a maioria das xilanases fúngicas apresentam pH ótimo para hidrólise da xilana na faixa de 4,5 a 6, apesar de serem normalmente estáveis numa faixa de pH de 3-8 (KORMELINK et al., 1993; FERNADEZ-ESPINAR, 1994; ANGELO, 1995; KIMURA, et al., 1995).

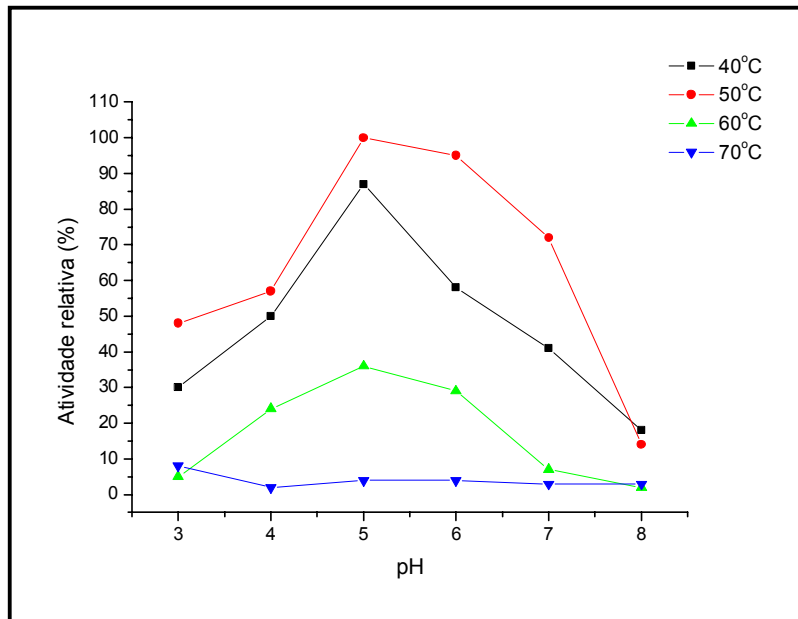


FIGURA 4. 25. Avaliação da temperatura e pH ótimos para atividade das xilanases do extrato bruto.

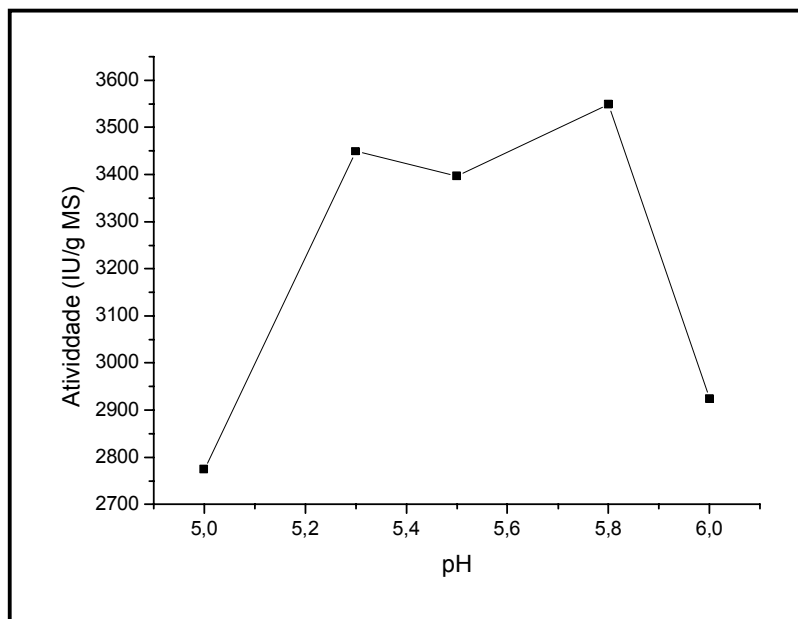


FIGURA 4. 26. Perfil de atividade enzimática em relação à melhor faixa de pH (5 a 6).

SHAH e MADAMWAR (2005) também obtiveram os valores 5,3 and 50°C como pH ótimo e temperatura, respectivamente, para atividade de xilanase produzida por *Aspergillus foetidus*. As condições ótimas para determinação de atividade de uma xilanase produzida por uma linhagem de *Aspergillus giganteus* foi de 50°C e pH 6 (COELHO e CARMONA, 2003), e estão próximas dos valores encontrados neste trabalho.

As características da xilanase produzida por *A. niger* LPB 326 revelam um grande potencial para aplicação devido ao aumento da demanda no uso de preparações de xilanase com um pH ótimo < 5,5, produzidas invariavelmente a partir de fungos (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2000). Por exemplo, para a aplicação em alimentação animal a enzima precisa ser ativa à temperatura (aproximadamente 40°C) e pH (aproximadamente 4,8) do trato digestivo (CAMPENHOUT et al., 2003).

#### 4.10.2. Estudo da estabilidade enzimática em relação à temperatura

A estabilidade térmica é um aspecto muito importante quando se considera a aplicação industrial de enzimas.

A estabilidade das xilanases presentes no extrato bruto foi avaliada a 50 e 60°C, na ausência (sem tratamento) e presença de xilana padrão e xilana extraída do bagaço de cana (xilana BC). Na temperatura de 50°C, a enzima sem tratamento perdeu cerca de 4% da atividade nos primeiros 5 minutos; na presença de xilana padrão e xilana BC essa perda é reduzida em 50%. Em 30 minutos de tratamento, a enzima sem tratamento manteve 84% da atividade, e com os tratamentos 87% de atividade, em média (Figura 4.27).

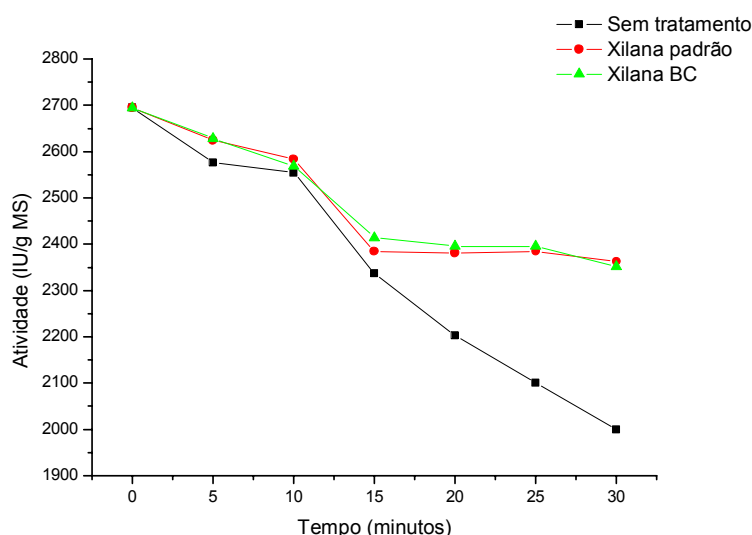


FIGURA 4.27. Perfil de atividade enzimática em relação ao tempo para temperatura de 50°C, com e sem tratamento.

A taxa de inativação enzimática para cada tempo (alíquotas retiradas em cada tempo) foi determinada pela reação de primeira ordem, obtida através das seguintes equações:

$$\%A = \%A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$\text{Ln} \frac{\%A}{\%A_0} = -kt \quad (2)$$

Onde,  $A_0$  = atividade enzimática inicial e  $A$  = atividade enzimática residual

O valor da constante  $k$  foi obtido a partir dos valores do coeficiente angular das retas formadas através do gráfico de logaritmo natural da % de atividade enzimática residual pelo tempo de pré-incubação (ANGELO, 1995).

A meia vida da enzima (que corresponde ao tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida à metade da atividade original) foi calculada através da equação:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k} \quad (3)$$

a qual resultou da seguinte equação (para a inativação enzimática que obedece à equação simples de primeira ordem):

$$\text{Ln} \left( \frac{1}{2} \right) = k t_{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

O valor das constantes  $k$  (obtidas a partir do gráfico 4.28) e da meia vida na temperatura de 50°C, podem ser observados na Tabela 4.17.

TABELA 4.17. Constante k e meia vida da xilanase nos diferentes tratamentos para temperatura de 50°C.

Atividade Enzimática	Valores de k (min <sup>-1</sup> )	Meia vida (min)
Sem tratamento	0,00766	90
Xilana padrão	0,00690	100
Xilana BC	0,00639	108

A constante calculada para xilanase presente no extrato bruto sem tratamento apresentou um valor maior que as constantes dos tratamentos com xilana padrão (XP) e xilana BC (XBC), indicando um efeito estabilizador dos polímeros e ou subprodutos (como xilose) sobre a xilanase, ou ainda o estabelecimento de um complexo enzima-substrato. As constantes de inativação de primeira ordem são frequentemente menores no caso da existência de complexos enzima-substrato, enzima-inibidor e enzima-produto, o que auxilia na explicação dos efeitos estabilizadores substanciais de ligantes adequados, especialmente em concentrações onde exista baixa quantidade de enzima livre (LSBU, 2004). Considerando os valores obtidos para a meia vida da xilanase, o tratamento que garantiu maior estabilidade foi com a presença de xilana BC (extraída do bagaço de cana), correspondendo a 108 minutos à 50°C.

Nos estudos realizados por SHAH e MADAMWAR (2005), a meia vida da xilanase produzida por *Aspergillus foetidus* foi de 57,53 minutos à 50°C, a qual foi menor do que a obtida neste trabalho no ensaio sem tratamento (90 minutos). No entanto, os autores destacam que a termoestabilidade foi aumentada pela aplicação dos aditivos: glicerol, trealose e Ca<sup>++</sup>. O complexo xilanólítico de uma cepa de *A. giganteus* apresentou baixa estabilidade térmica, com meia vida de 13 minutos e 1 minuto quando incubado à 50 e 60°C, respectivamente (COELHO e CARMONA, 2003).

A presença de polissacarídeos podem exercer um efeito protetor diante da inativação térmica (SAMBORSKA et al., 2005). A estabilidade da xilanase pode ser ocasionada devido ao efeito protetor de qualquer soluto compatível, tais como o substrato polimérico xilana e/ou xilooligosacarídeos resultantes da hidrólise (DAMASO et al., 2002), o que pode ser evidenciado nas Figuras 4.27 e 4.28. Devido ao efeito protetor dos açúcares e da redução do conteúdo de umidade que



aumentam a estabilidade enzimática, os valores de k para a inativação térmica exibem a tendência de diminuição.

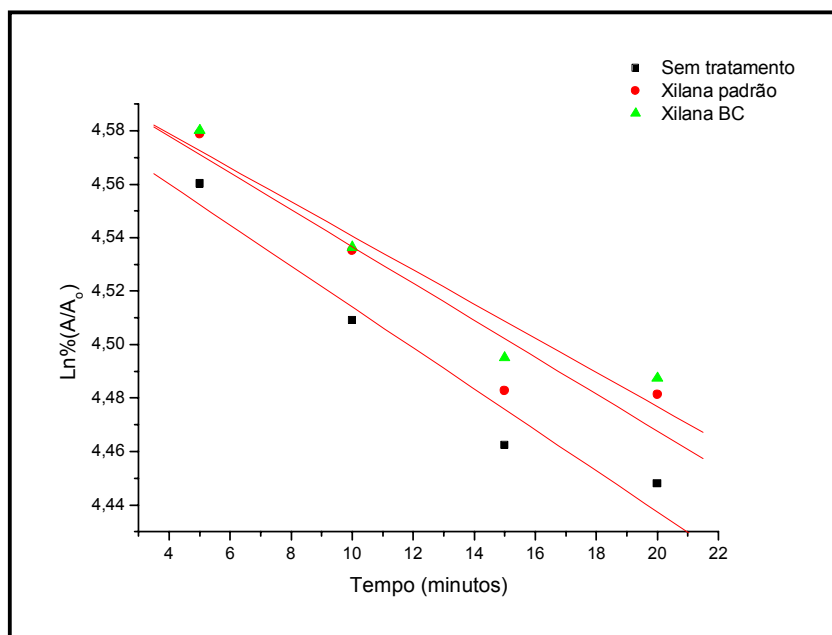


FIGURA 4.28. Inativação térmica da xilanase à 50°C com e sem tratamento. ST – sem tratamento ( $R^2 = 0,97$ ); XP – xilana padrão ( $R^2 = 0,95$ ); XBC – xilana do bagaço de cana ( $R^2 = 0,97$ ).

A desnaturação de enzimas pela ação do calor deve-se primariamente as interações protéicas com o meio aquoso; sendo assim, as enzimas são geralmente mais estáveis em soluções concentradas (do que diluídas). Num estado seco ou predominantemente desidratado (por exemplo, enzimas liofilizadas) as enzimas permanecem ativas por períodos consideráveis, até mesmo acima de 100°C (SAMBORSKA et al., 2005). Esta propriedade têm grande significado tecnológico e está sendo muito explorada atualmente.

Na Figura 4.29, pode-se observar uma redução na atividade enzimática até o tempo de 15 minutos para todas as condições estudadas; entre 15 e 25 minutos os tratamentos com xilana padrão e xilana BC exerceram uma redução na queda da atividade, o que não aconteceu com a enzima sem tratamento.

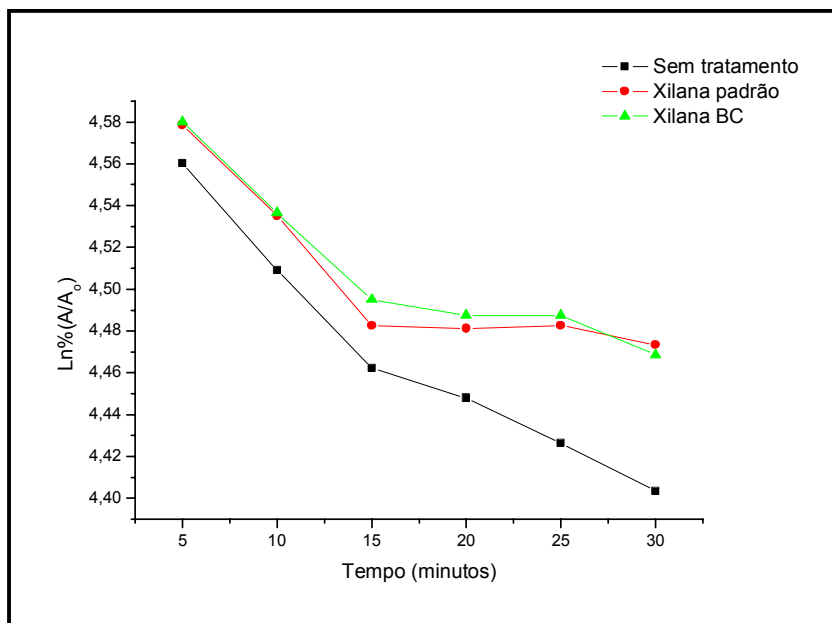


FIGURA 4. 29. Relação de atividade enzimática e tempo na temperatura de 50°C.

Em relação à temperatura de 60°C, pode-se observar na Figura 4.30, uma queda acentuada na atividade enzimática nos primeiros 5 minutos em todas as condições estudadas.

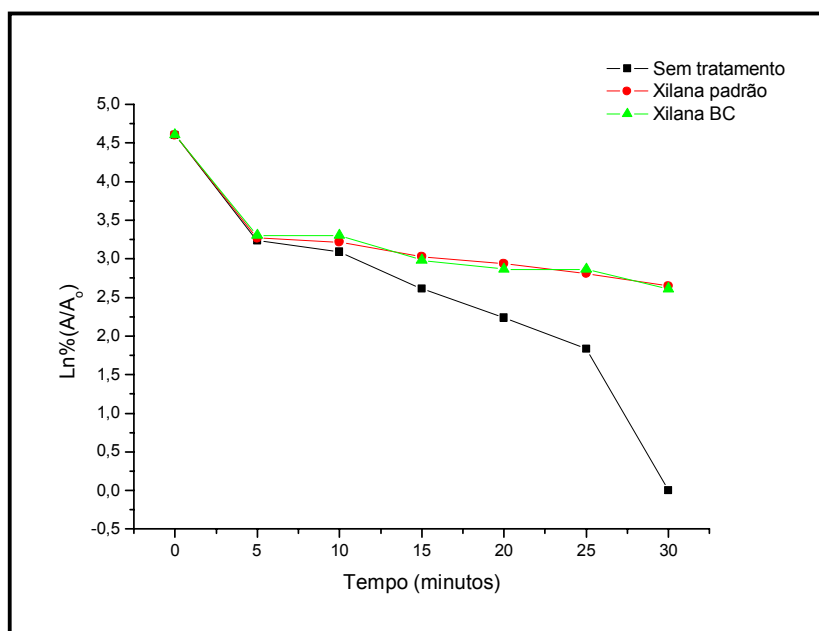


FIGURA 4.30. Atividade enzimática em relação ao tempo com a ação da temperatura (60°C).

Após este período de tempo, os substratos aplicados reduziram a velocidade na perda de atividade, aumentando a meia vida da enzima (Tabela 4.18). A temperatura de 60°C mostrou uma grande influência na atividade das xilanasas produzidas neste trabalho, sendo que estas não apresentam boa estabilidade frente a esta temperatura, o que pode ser observado pelo aumento nos valores de k (constante de inativação) e na diminuição da meia vida enzimática (Tabela 4.18) em relação aos valores obtidos para a temperatura de 50°C.

TABELA 4.18. Constante k para temperatura de 60°C.

Atividade Enzimática	Valores de k (min <sup>-1</sup> )	Meia vida (minutos)
Sem tratamento	0,06942	10
Xilana padrão	0,02371	29
Xilana BC	0,03271	21

No entanto, os valores de meia via enzimática obtidos à 60°C neste trabalho foram maiores que o valor de 6,5 minutos encontrados para uma xilanase de uma cepa de *Aspergillus* estudada por CAMACHO e AGUILAR (2003).

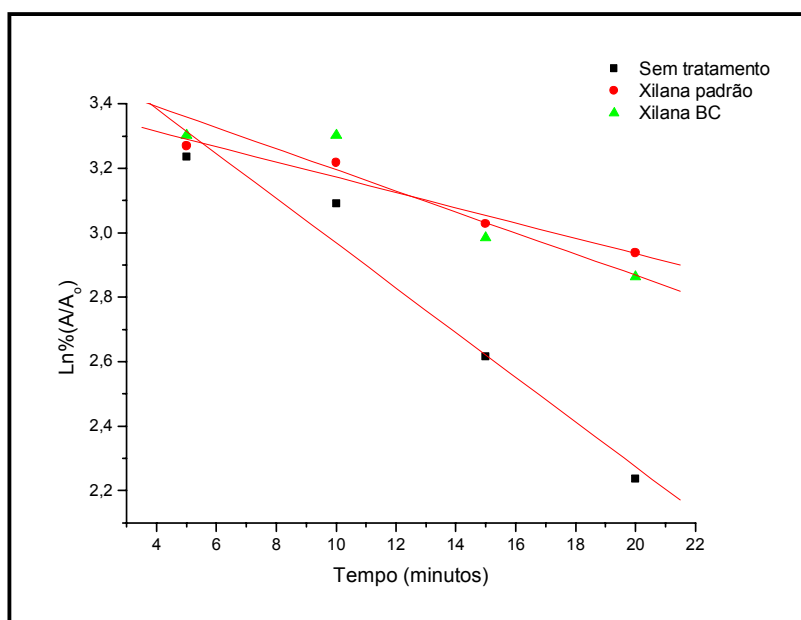


FIGURA 4.31. Inativação térmica da xilanase à 60°C com e sem tratamento. ST – sem tratamento ( $R^2 = 0,98$ ); XP – xilana padrão ( $R^2 = 0,98$ ); XBC – xilana do bagaço de cana ( $R^2 = 0,94$ ).

O tratamento com xilana padrão apresentou a maior conservação da atividade enzimática para a temperatura de 60°C em relação às outras condições estudadas (Figura 4.31).

A partir deste estudo pode-se ainda avaliar em estudos futuros as concentrações de substrato empregado, tempo de homogeneização (maior ligação enzima-substrato), entre outras condições.

Também foi testada a influência de alguns polióis como o glicerol e o manitol na manutenção da atividade enzimática frente à temperatura, visto que os polióis têm a capacidade de formar pontes de hidrogênio que possuem um papel fundamental na manutenção da conformação nativa e estabilização da proteína (KHANDEPARKAR et al., 2006). No entanto, estes aditivos não mostraram resultados satisfatórios em relação ao controle (sem tratamento) nas temperaturas estudadas. Na temperatura de 50°C o manitol e o glicerol mantiveram 83% e 82% de atividade enzimática em 30 minutos, respectivamente, enquanto que a enzima sem tratamento apresentou 84% de atividade. Em relação à temperatura de 60°C, o extrato enzimático sem tratamento foi inativado para xilanase aos 30 minutos, enquanto que na presença de manitol e glicerol a inativação ocorreu em 20 e 30 minutos, respectivamente. Devido à proximidade dos valores com o extrato enzimático sem tratamento, esses aditivos (manitol e glicerol) não exerceram uma ação estabilizadora nas concentrações estudadas.

Um efeito contrário foi obtido no trabalho realizado por KHANDEPARKAR (2006), onde a estabilidade da xilanase produzida aumentou com a adição de polióis (sorbitol e manitol). Nos estudos realizados por BANDIVADEKAR e DESHPANDE (1994), tanto o glicerol como o sorbitol, manitol (10%) ou a glicina (1M) tiveram um efeito irrelevante na termoestabilidade da xilanase produzida por *Chainia* sp. No entanto os autores observaram que a adição de ions  $Ca^{+2}$  ou Polietilenoglicol (10mM) aumentou a meia vida da enzima na temperatura de 60°C, a cisteína (10mM) e o Tween-80 (1%) mostraram 70% de proteção contra inativação térmica e a xilana (3%) ofereceu proteção completa contra inativação da enzima à 60°C e pH 9.

A estabilidade da xilanase pode ser aumentada por diversos métodos, incluindo mutação aleatória e dirigida, manipulação de pontes dissulfeto, modificação química e o uso de aditivos (SÁ-PEREIRA et al., 2003). Esses métodos podem ser úteis para converter uma ampla diversidade de enzimas

termosensíveis em termoestáveis e termoativas para uma gama de aplicações biológicas, médicas e industriais (SÁ-PEREIRA et al., 2003).

#### 4.10.3. Estabilidade do extrato bruto em relação ao pH

O extrato bruto manteve uma boa estabilidade numa faixa de pH variando de ácido até neutro, com os melhores valores de atividade residual encontrados nos pHs de 5,0-7,0 (Figura 4.32), mostrando um pequeno aumento de atividade no período de 2 a 3 horas para pH 5,0 e 6,0, com posterior queda.

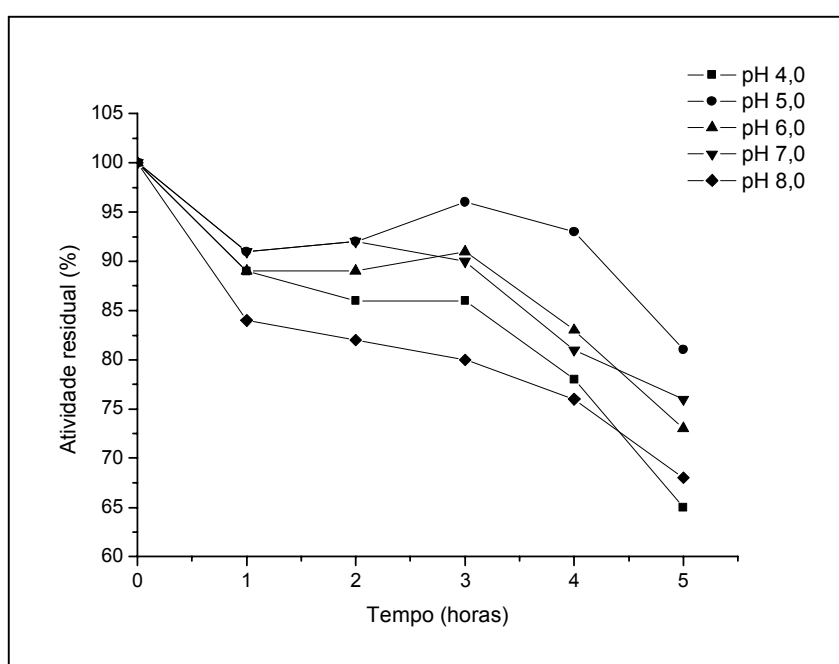


FIGURA 4. 32. Atividade xilanólítica presente no extrato bruto submetido à pHs diferentes durante um período de até 5 horas.

Durante o período de 1-3 horas, a atividade enzimática residual média no extrato bruto foi de 87%, 93%, 90%, 91% e 82% para os pHs 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, respectivamente, com atividade máxima em pH 5,0. D-xilanasas de diferentes microrganismos são geralmente estáveis em uma ampla faixa de pH (3-10) e apresentam pH ótimo numa faixa de 4-7 (KULKARNI et al., 1999).

No estudo realizado por HEIDORNE *et al.* 2006, a estabilidade de xilanasas produzidas a partir de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*, foi máxima em pH 5,0, mantendo atividades elevadas após a incubação em pHs variando de 3,5 até 6,5. Valores ótimos de pH para atividade e estabilidade foram

encontrados na faixa de 4,0-6,0 para uma endo-xilanase produzida por *Aspergillus niger*, segundo trabalho de FREDERICK, *et al.*, 1981. No caso das xilanases produzidas a partir de *Aspergillus sp.* 2M1 no estudo conduzido por ANGELO, 1995, a atividade foi mantida entre pH 4,5 a 6,0, com um ponto ótimo em 6,0. A maioria das xilanases fúngicas apresentam pH ótimo nesta faixa (ANGELO, 1995).

#### 4.10.4. Efeito do congelamento do extrato bruto

O congelamento à -20°C ou -80°C são os métodos mais comuns de armazenamento de proteínas à frio. No entanto, o congelamento de soluções enzimáticas freqüentemente causa desnaturação estrutural e perda de função biológica (HELLER *et al.*, 1997), devido às variações de pH e 'stress' (agregação, desdobramentos e dissociações) causados pela formação de cristais de gelo e ciclos de congelamento-descongelamento, o que reduz a estabilidade enzimática.

Pode-se observar na Figura 4.33 que o armazenamento do extrato bruto contendo xilanase à -20°C resultou em maior redução na atividade inicial no primeiro dia (média de 23% considerando todas as condições). Do primeiro para o quinto dia a perda de atividade foi menos acentuada. O tratamento com xilana extraída do bagaço de cana (XE) foi o mais efetivo mantendo 83% e 75% de atividade de xilanase no primeiro e quinto dias, respectivamente, o que foi superior aos valores obtidos a partir do extrato bruto sem tratamento (79% e 68%). Os tratamentos com xilana padrão e glicerol mostraram uma perda mais acentuada de atividade no primeiro dia, mantendo 76% e 70%, respectivamente, no entanto, as perdas foram menores do primeiro para o quinto dia (de 76% para 72% no tratamento com xilana padrão), com um pequeno aumento na atividade enzimática residual, com o glicerol (72%).

O glicerol é um agente estabilizante ao frio bastante conhecido, que previne a formação de cristais de gelo; no entanto, o baixo efeito protetor neste trabalho foi provavelmente devido à baixa concentração utilizada.

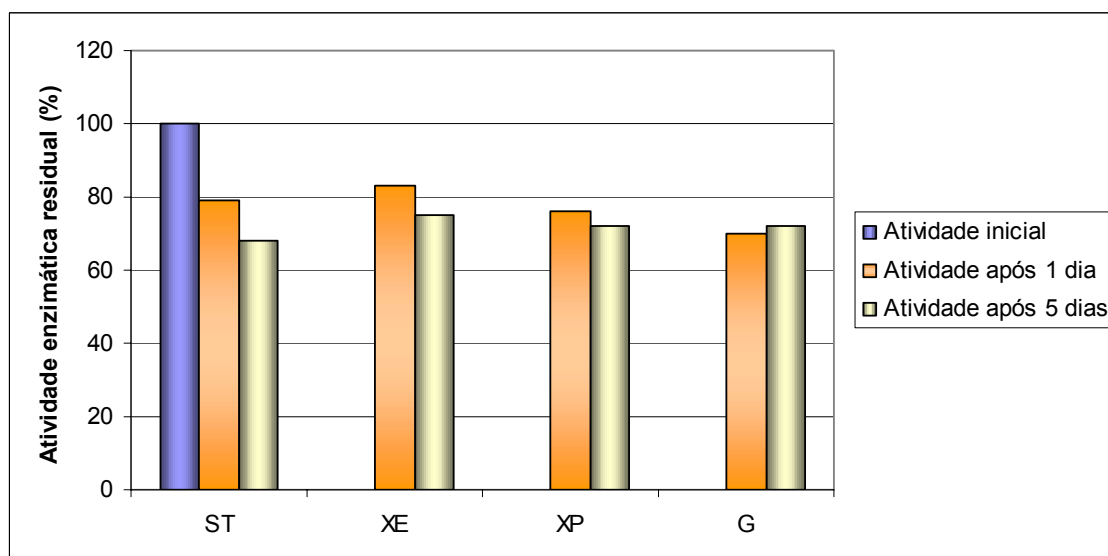


FIGURA 4.33. Análise do efeito do congelamento na atividade da xilanase presente no extrato bruto sem tratamento (ST) e na presença de xilana extraída do bagaço de cana (XE), xilana padrão Sigma (XP) e glicerol (G).

Portanto o método de congelamento aplicado neste trabalho não conservou totalmente a atividade enzimática, e outras metodologias devem ser estudadas para melhorar a estabilidade enzimática ao frio, visto que a estabilidade durante o armazenamento é um importante parâmetro de qualidade para processos que utilizam enzimas. Entretanto, observou-se que o polissacarídeo xilana pode exercer um efeito positivo na conservação da estrutura enzimática da xilanase e, conseqüentemente, de sua atividade.

#### 4.10.5. Efeito da presença de alguns íons

Este estudo foi realizado para se avaliar a influência de alguns íons e metais na atividade da xilanase produzida (presente no extrato bruto). De acordo com CONN e STUMPF, 1987, aproximadamente um terço das enzimas conhecidas possuem metais como parte de suas estruturas. As enzimas podem ser moduladas pela interação de cátions com resíduos de aminoácidos presentes no seu sítio ativo. Tais interações podem aumentar (modulação positiva) ou diminuir (modulação negativa) a atividade catalítica (BRECCIA et al., 1998; BATAILLON et al., 2000; GHANEM et al., 2000; DAMASO et al., 2002).

A atividade da xilanase obtida mostrou que dentre os sete componentes estudados somente o  $Mg^{2+}$  exerceu um efeito positivo na atividade enzimática, resultando em um aumento de 14%. Todos os outros inibiram a atividade enzimática na concentração estudada (como mostrado na Figura 4.34).

Querido et al., 2006, observou que o  $Mg^{2+}$  e ao  $Al^{3+}$  exerceram um efeito positivo na atividade da xilanase, aumentando a atividade em 31% e 28%, respectivamente.

A inibição de endo-xilanases por diferentes compostos químicos específicos fornece informações sobre seu sítio ativo e sobre o mecanismo de catálise. Os íons metálicos  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  e  $Ag^{+}$  podem inibir alguns tipos de xilanases. Efeito contrário foi mostrado pelos íons cálcio, manganês e zinco para uma endo-xilanase clonada em *Streptomyces sp* (KLUEPFEL, et al., 1992).

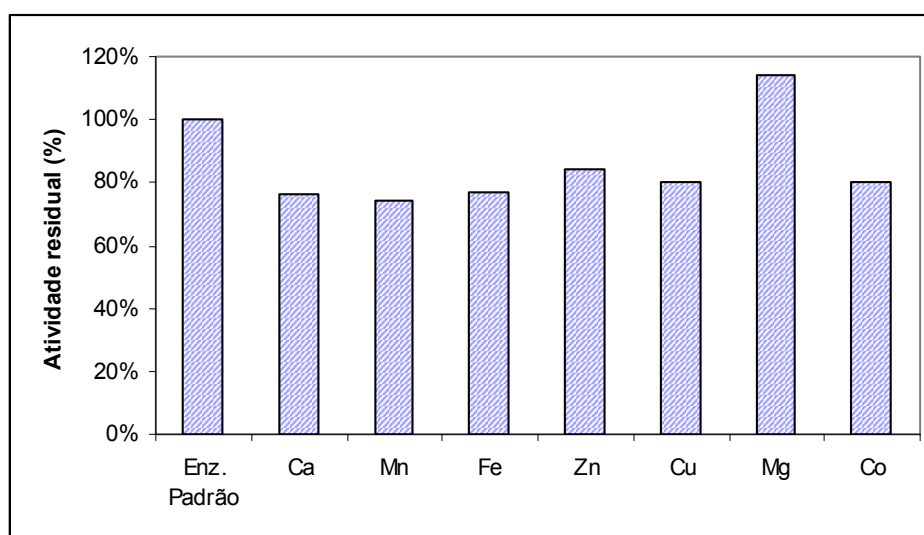


FIGURA 4. 34. Efeito da adição de alguns íons na atividade da xilanase produzida por *A. niger* LPB 326.

#### 4.10.6. Determinações cinéticas enzimáticas

As taxas iniciais de reação da hidrólise da xilana padrão foram determinadas sob diferentes concentrações do substrato variando de 2 a 20 mg de substrato/mL de tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5,3 à 50°C. As constantes  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram estimadas de acordo com o método de Lineweaver e Burk,



utilizando o gráfico duplo recíproco (apresentado na Figura 4.35), correspondendo a 3,79 mg/mL e 5,97  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente (Figuras 4.35 e 4.36).

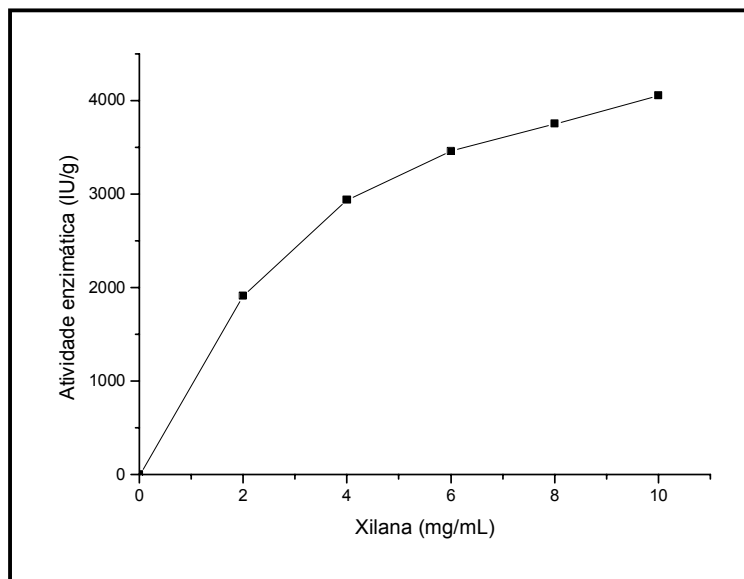


FIGURA 4. 35. Efeito da concentração de substrato (xilana tipo birchwood) na atividade da xilanase produzida por *A. niger* LPB 326 em FES.

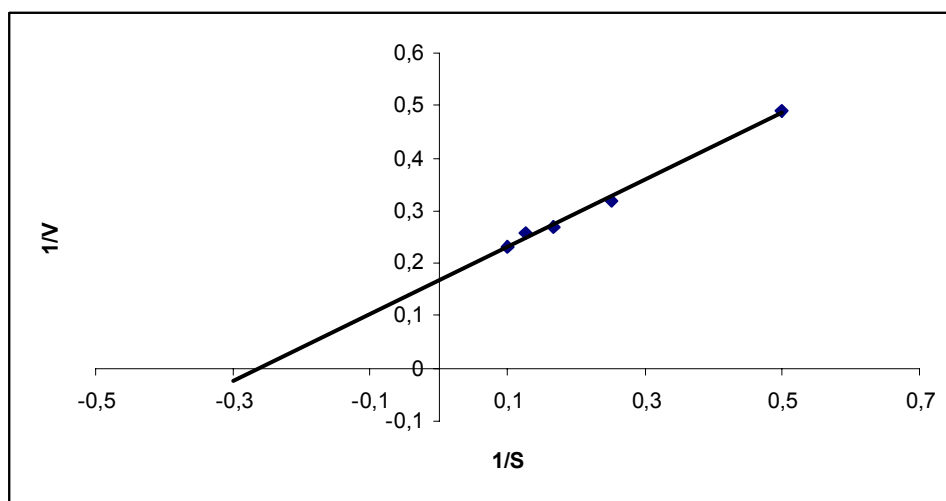


FIGURA 4. 36. Gráfico duplo recíproco para determinar os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  da xilanase a partir da xilana tipo birchwood à 50°C.

A afinidade da xilanase obtida neste trabalho foi similar à xilanase de uma linhagem de *Aspergillus*, a qual apresentou um valor de  $K_m$  de 3,8 mg/mL, utilizando xilana tipo birchwood como substrato (CAMACHO e AGUILAR, 2003).

#### 4.11. Cinética final de produção em frascos Erlenmeyer

A cinética final de produção conduzida em frascos Erlenmeyer foi realizada a partir das condições otimizadas de pH, umidade, temperatura e solução mineral. A extração enzimática otimizada também foi aplicada. O perfil de produção enzimática em relação ao tempo foi inversamente proporcional ao pH, como pode ser visualizado na Figura 4.37.

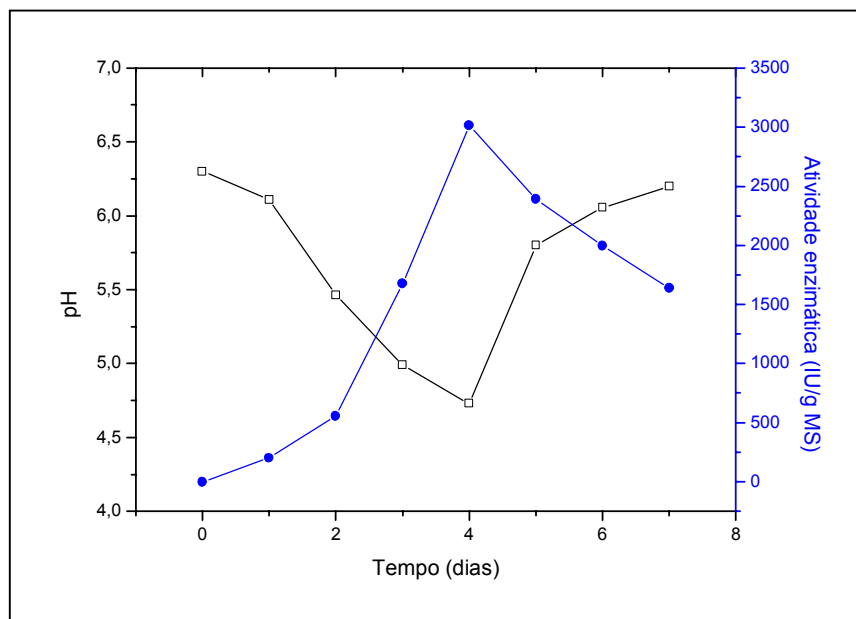


FIGURA 4. 37. Evolução da atividade enzimática e pH em relação ao tempo.

Essas características confirmam os resultados da cinética inicial realizada logo após a escolha da cepa (ver item 4.2, Figura 4.3). O valor de pH 4,73 foi observado no ápice de produção de xilanase (3.015 UI/gms).

Em relação ao consumo de açúcares totais, observa-se uma redução acentuada (de 71 g/L chegando a 3,5 g/L no quarto dia de fermentação) até a produção máxima de xilanase, como mostra a Figura 4.38.

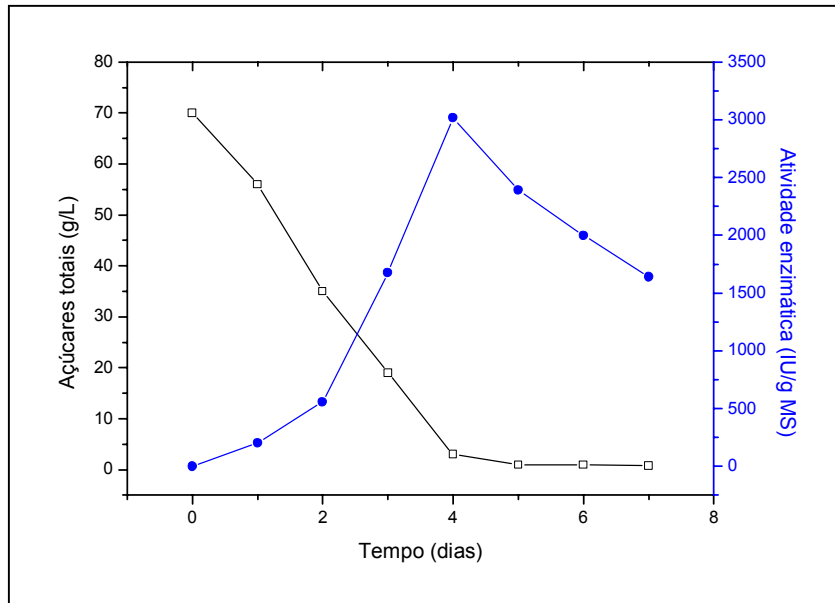


FIGURA 4. 38. Consumo de açúcares e produção de xilanase durante 7 dias de fermentação com *A. niger* LPB 326.

A atividade de água ( $a_w$ ) reduziu consideravelmente até o segundo dia de fermentação (de 0,980 a 0,972), com um pequeno decréscimo no terceiro dia. No entanto, no quarto (máxima produção enzimática) e quinto dias de fermentação a  $a_w$  aumentou (de 0,971 para 0,974), provavelmente pela liberação de água do metabolismo enzimático, diminuindo novamente a partir do sexto dia (Figura 4.39).

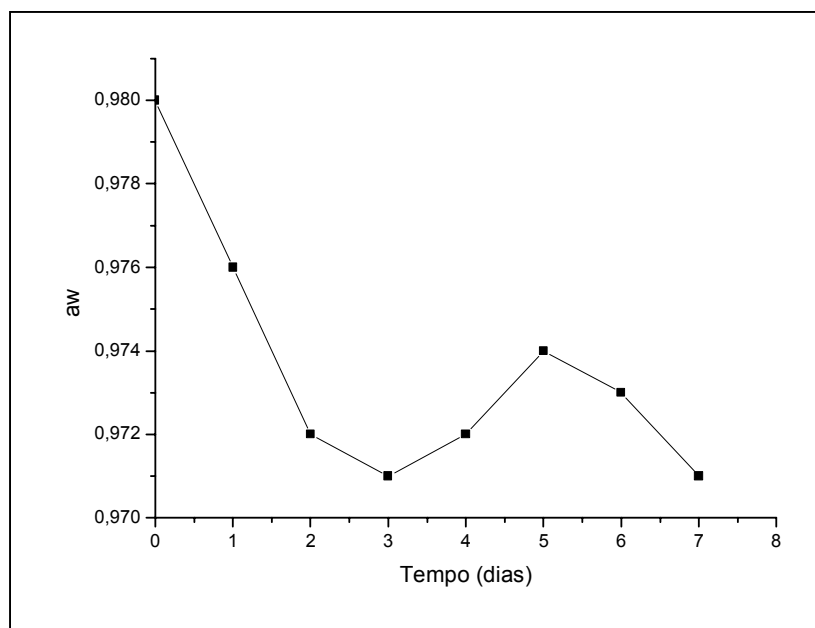


FIGURA 4. 39. Perfil de atividade de água em relação ao tempo de fermentação.

#### 4.12. Liofilização do extrato bruto enzimático

A secagem por sublimação também conhecida como liofilização consiste em um processo de desidratação do material através da sublimação da parte congelada a baixas temperaturas e sob vácuo. Os produtos processados por esta técnica sofrem mínima degradação química, física e microbiológica. Portanto, a desnaturação de proteínas, reações de caramelização de açúcares, de oxidação de lipídeos e enzimáticas quase não ocorrem (ALCAIDE & LOBRAÑA, 1983).

A liofilização é método estabelecido para estabilização de proteínas, no entanto o uso de aditivos é frequentemente necessário para a preservação da estrutura e atividade da proteína durante o processo. Para reduzir os problemas da liofilização, geralmente são adicionadas formulações estabilizadoras de proteínas, como: açúcares, polióis, aminoácidos ou polímeros, sendo necessários, às vezes, o uso de estabilizadores múltiplos. Em alguns casos também são adicionados agentes inertes para garantir uma boa estética do produto. A formulação final pode resultar em uma mistura complexa de substâncias macromoleculares e sais tamponantes (HELLER et al., 1997). No entanto, as interações moleculares entre a proteína e o aditivo protetor não são facilmente esclarecidas (WARD et al., 1999).

Portanto, existem alguns fatores que são aplicáveis à estabilidade protéica durante a liofilização. Principalmente, o papel da água residual, a sua interação com a molécula protéica e a retenção na matriz seca são todos importantes para o sucesso no processo de liofilização (FRANKS, 1982).

Na tentativa de aumentar o teor de sólidos, reduzir o tempo de liofilização e manter a estrutura enzimática para evitar a desnaturação durante o processo (congelamento e secagem), diferentes concentrações (1-4%) de manitol (MT) e leite em pó desnatado (LP) foram adicionadas a alíquotas (5 mL) de extrato enzimático bruto antes da liofilização. Os resultados de atividade enzimática residual estão presentes na Tabela 4.19.

O nível de proteção obtido com o manitol foi dependente da concentração deste aditivo. O pré-tratamento com manitol na concentração de 3% (MT3) resultou em 98% de atividade xilanolítica residual. Ao liofilizarem a enzima L-asparaginase, WARD et al. (1999) observaram que na ausência de aditivos estabilizantes, o tetrâmero biologicamente ativo de massa molar igual a 134 kDa é

quebrado originando um monômero inativo de 34 kDa. Ainda constataram que o uso de açúcares como a lactose, sacarose, glicose e maltose e também o uso de manitol podem preservar a estrutura protéica e que ao aumentarem a concentração desses aditivos, a estrutura tetramérica seria menos afetada.

TABELA 4.19. Efeito da liofilização na atividade da xilanase presente em amostras pré-tratadas com Manitol (MT) ou Leite em pó desnatado (LP) em diferentes concentrações.

Condições	Atividade residual
MT1	59%
MT2	71%
MT3	98%
MT4	64%
LP1	Concentrada 7,8 vezes
LP2	Concentrada 2,6 vezes
LP3	Concentrada 2,4 vezes
LP4	Concentrada 1,4 vezes

O uso de leite em pó desnatado na concentração de 1% (LP1) evitou a perda de atividade durante o processo de liofilização e a enzima foi concentrada 7,8 vezes (Tabela 4.19). No entanto, ao aumentar a concentração do leite em pó, houve uma redução na atividade enzimática; portanto outros estudos são necessários para entender o mecanismo protetor e verificar os efeitos das concentrações. De acordo com MILAGRES et al. (2005), um extrato enzimático (com massa molecular abaixo de 30kDa) foi concentrado 25 vezes pela liofilização.

JIANG & NAIL (1998), utilizando três enzimas como modelo, constataram que na ausência de sais tampões na secagem houve uma diminuição da atividade dessas três enzimas e, através de estudos comparativos, verificaram que quanto maior a concentração das mesmas, menores são as perdas de atividade, o que justifica a utilização de uma processo de concentração antes da liofilização para extratos enzimáticos muito diluídos. Estudos semelhantes também foram conduzidos por CORNELEY & REMON (1996) ao utilizarem a enzima lactato

desidrogenase (LDH). Ao secarem essa enzima na ausência de estabilizantes, 80% de sua atividade foi perdida. Ao adicionarem açúcares como sacarose e maltose houve um aumento significativo na sua atividade. Estes autores verificaram também que melhores resultados foram obtidos utilizando-se maltodextrinas e PEG 8000 como estabilizantes, e que o efeito obtido pelas maltodextrinas foi dependente de seu grau de esterificação e concentração.

#### 4.13. Fermentação em Coluna Aeradas

##### 4.13.1. Otimização da aeração e umidade em colunas

A otimização das condições de aeração e umidade são fundamentais para a adaptação da FES conduzida em frascos para os reatores de coluna de Rimbault.

Pode-se observar na Figura 4.40 que a aeração e a umidade foram significativas estatisticamente nos níveis estudados, com valor de  $p > 0,05$ .

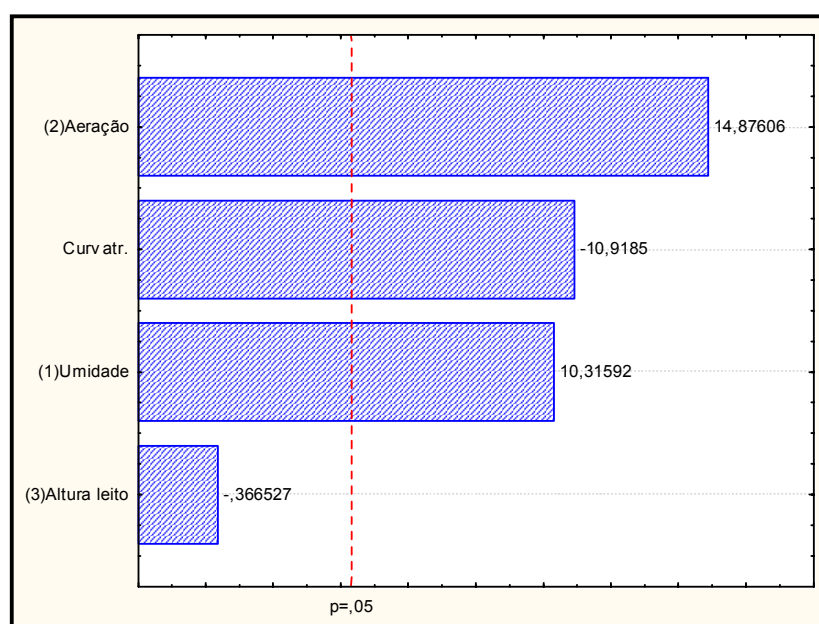


FIGURA 4. 40. Gráfico mostrando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) aeração e umidade, estudados na fermentação em colunas de Rimbault.

A variável altura do leito não foi significativa, sendo o oposto do resultado encontrado por PANDEY et al., 1996, que observou que a altura do leito (altura de preenchimento do meio sólido) nas colunas exerceu um efeito significativo na

produção de uma glicoamilase por *A. niger*, devido à compactação do substrato nas colunas.

A Figura 4.41 mostra uma tendência de aumento na produção enzimática com a utilização dos parâmetros aeração e umidade ajustados em 3mL.g<sup>-1</sup> e entre 70-75%, respectivamente.

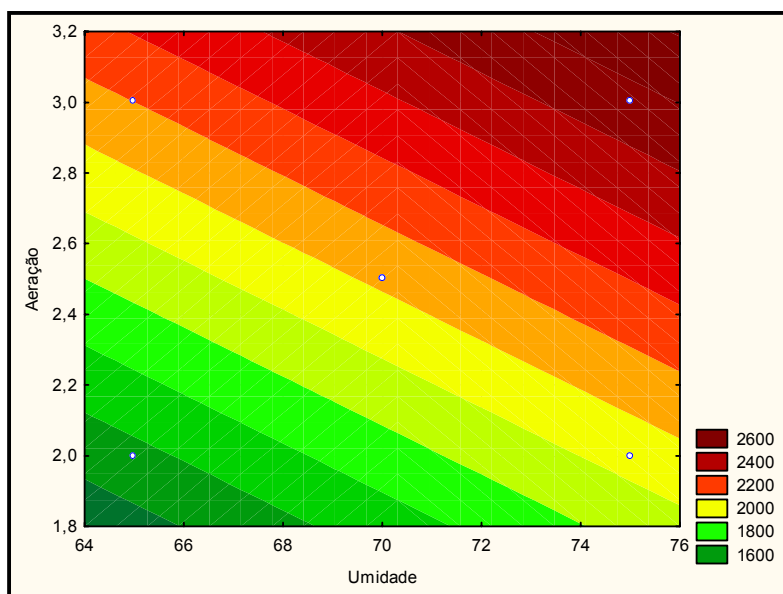


FIGURA 4. 41. Gráfico de contorno da taxa de aeração e umidade na fermentação em colunas.

A análise de regressão foi realizada para ajustar a função de resposta com os dados experimentais. A Tabela 4.20 mostra a análise de variância dos fatores estudados (aeração e umidade), os quais foram ajustados de acordo com o modelo quadrático com duas interações (linear, quadrático). Os dados obtiveram um bom ajuste pelo modelo utilizado, com  $R^2=0,99$ .

TABELA 4.20. ANOVA obtida a partir dos dados de aeração e umidade.

	SS	df	MS	F	p
(1)Umidade*	1018934	1	1018934	2624,963	0,000381
(2)Aeração	2285	1	2285	5,886	0,136058
1 by 2	2285	1	2285	5,886	0,136058
Erro	776	2	388		
SS Total	1024280	5			

\* Parâmetros significativos em 95% de confiabilidade ou  $p \leq 0,05$

## 5. Conclusão

### 1) Produção de xilanases

- O teste qualitativo (xilana-agar) pode ser empregado para seleção inicial de cepas produtoras de xilanase. Alternativamente, pode-se substituir a xilana comercial por xilana extraída a partir de material lignocelulósico.
- A melhor composição do meio e parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho, para produção de um concentrado enzimático rico em xilanase em FES, utilizando *Aspergillus niger* LPB 326 foi:
  - Bagaço de cana + Farelo de soja nas proporções de 65 e 35%, respectivamente;
  - Umidade inicial de 85%, temperatura de 30°C, pH natural do substrato (sem ajuste), incubação por 4 dias;
  - Solução mineral composta por:  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{CoSO}_4$  nas concentrações de 0.4 g/L, 1.5 g/L e 0.0012 g/L, respectivamente.
  - Tween 80 exerceu efeito positivo sobre a produção de xilanase, aumentando em 6% a atividade enzimática.
- Em relação à extração da enzima, as melhores condições foram:
  - 37 mL de solução de extração em 3 g de fermentado;
  - Agitação à 133 rpm em shaker por 5 minutos, com posterior centrifugação do extrato enzimático à 3500 rpm por 10 minutos.
- A melhor condição de secagem do material fermentado foi na temperatura de 42°C por 20 horas. O tratamento com cloreto de cálcio, exerceu um efeito positivo na temperatura de 50°C.



- Em relação à cinética final de produção em frascos pode-se destacar que:
  - O menor valor de pH (pH 4,73) foi observado no ápice de produção de xilanase (3.015 UI/gms), no quarto dia de fermentação, com  $a_w$  de 0,972.
- A aeração e a umidade foram significativas na otimização das condições de fermentação em colunas de Raimbault. O uso de uma umidade inicial mais baixa que a utilizada em frascos favorece o processo, evitando a contaminação.

## 2) Propriedades do extrato enzimático bruto

- As atividades enzimáticas a 50°C mostraram ser maiores para todos os pH estudados (exceto pH 8,0). Pode-se considerar que a faixa de pH de 5,3 a 5,8 proporciona as melhores atividades da xilanase produzida.
- A xilanase produzida mostrou ser mais estável à 50°C, com grandes perdas de atividade à 60°C, e a presença de Xilana padrão e Xilana BC exerceram efeitos positivos na conservação da atividade enzimática com prolongamento da meia-vida da enzima.
- O  $Mg^{+2}$  aumentou a atividade enzimática da xilanase presente no extrato bruto na concentração estudada.
- As constantes  $K_m$  e  $V_{máx}$  foram estimadas de acordo com o método de Lineweaver e Burk correspondendo a 3,79 mg/mL e 5,97  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente.
- O extrato bruto liofilizado na presença de manitol (3%) manteve 98% de atividade enzimática e o uso de leite em pó desnatado (1%) resultou num produto mais concentrado (7,8 vezes).

## Sugestões para trabalhos futuros

- Manipular geneticamente o microrganismo *Aspergillus niger* 326, melhor produtor neste trabalho, na tentativa de obter maiores atividades de xilanase.
- Otimizar a extração da hemicelulose/xilana, podendo considerar outras metodologias, afim de aumentar o rendimento, e testar no meio de produção de forma a induzir uma maior produção, e também durante a liofilização.
- Testar novas metodologias, aditivos, equipamentos, ou processos de secagem do material fermentado e do extrato enzimático, a fim de evitar a desnaturação da enzima, possibilitar a conservação e melhorar a solubilidade da enzima após a secagem.
- Aplicar diferentes formulações de estabilizantes no extrato bruto enzimático e testar sua eficácia em diferentes temperaturas.
- Testar o potencial de sacarificação do concentrado enzimático produzido.
- Testar a estabilidade do concentrado rico em xilanase frente à enzimas digestivas, nas condições ideais de pH e temperatura.
- Avaliar a conservação da enzima com e sem a presença de aditivos em refrigerador e testar diferentes métodos de congelamento.
- Aumentar a escala do processo.
- Realizar uma nova otimização da fermentação em colunas e a respirometria.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, Y. R., OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, 38(1): 115-122, 2002.

ADSUL, M. G., GHULE, J. E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K. B., GOKHALE D. V., VARMA A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydr. Polym.* 57(1): 67-72, 2004.

ANGELO, R. S. Xilanases de *Aspergillus* sp. 2M1: produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas kraft. Dissertação de mestrado, Unicamp, Campinas, SP, 1995.

AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International, Washington, DC, USA, Association of Official Analytical Chemists, 2000.

ARNESEN, S., ERIKSEN, S.H., OLSEN, J., JENSEN, B. Increased production of  $\alpha$ -amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of Tween 80. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 249-252, 1998.

BAILEY, M. J., PULS, J., POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13: 380-389, 1991.

BAILEY, M.J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol* 23 (3): 257-271, 1992.

BAKIR, U., YAVASCAOGLU, S., GUVENC, F., ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enz. Microb. Technol.* 29(6): 328-334, 2001.

- BAKRI, Y., JACQUES, P., THONART, P. Xylanase Production by *Penicillium canescens* 10-10c in Solid-State Fermentation. Appl. Biochem. Biotechnol. 3: 105-108, 2003.
- BANDIVADEKAR, K. R. e DESHPANDE, V. V. Enhanced stability of cellulase-free xylanase from *Chainia* sp. (NCL 82.5.1). Biotechnology Letters 16: 179-182, 1994.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., MEJÍA, A. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. Biotechnol. Annu. Rev. 2: 85–121, 1996.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J. Microbiol. Biotechnol. 8(4): 353-368, 1992.
- BATAILLON, M., CARDINALI, A.P.N., CASTILLON, N., DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. Enz. Microb. Technol., 26: 187-192, 2000.
- BHAT, M. K. AND HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, ed. Bedford, M. R., Partridge, C.C. CAB International, Wallingford, UK, 2001, pp. 11-60.
- BCC – BCC Research, 2005. Enzymes for Industrial Applications. Endereço eletrônico: [www.bccresearch.com/chem/C147U.html](http://www.bccresearch.com/chem/C147U.html). Acessado em: 20/06/2006.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic system. Trends in Biotechnology 3: 286-290, 1985.
- BISWAS, S. R., JANA, S. C., MISHRA, A. K., NANDA, G. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechnol. Bioeng. 35 (3): 244 – 251, 1990.
- BISWAS, S.R., MISHRA, A.K. and NANDA, G. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses, Biotechnol. Bioeng. 31: 613–616, 1988.

BOCCHINI, D. A., OLIVEIRA, O.M.M.F., GOMES, E., SILVA, R. D. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 40(12): 3653-3659, 2005.

BRAND, D., PANDEY, A., ROUSSOS, S., SOCCOL, C.R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 127-133, 2000.

BRAY, M. R. and CLARKE, A. J. Essential carboxy groups in xylanase A. *Biochem. J.* 270(1): 91–96, 1990.

BRECCIA, J.D., SINERIZ, F., BAIGORI, M.D., CASTRO, G.R., HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enz. Microb. Technol.*, 22: 42-49, 1998.

BRICE, R.E., MORRISON, I.M. Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fiber in an artificial rumen. *Appl Biochem Biotechnol.* 30(1): 9-15, 1991.

CAMACHO, N. A. AND AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104(3): 159-172, 2003.

CAMPENHOUT, L. V., SOMERS, I., VAN DE CRAEN, S. AND ADAMS, C. In vitro test to evaluate protein degradation by feed enzymes. In *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*, ed. Courtin, C. M., Veraverbeke, W. S. and Delcour, J. A., Kat. Univ. Leuven., Leuven, 2003, pp.387-390.

CANNEL, E. ; MOO-YOUNG, M. Solid-State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, 6: 2 – 7, 1980.

CARVALHO, J.C. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. Tese de doutorado, UFPR, Curitiba, PR, 2004.

CASTILHO, L.R., MEDRONHO, R.A., ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* 71(1): 45-50, 2000.

CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. Norma de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do farelo de soja, 2004. Endereço eletrônico: <http://www.cidasc.sc.gov.br/html/legislacao/legislacao%20produtos/FareloSoja.htm>. Acessado em: 25/06/2006.

COELHO, G. D. AND CARMONA, E. C. Xylanolytic complex from *Aspergillus giganteus*: production and characterization. *J. Basic Microbiol.* 43(4): 267-277, 2003.

COM CIÊNCIA – Revista eletrônica de jornalismo científico. Bagaço de cana pode gerar energia, 2001. Endereço eletrônico: <http://www.comciencia.br/reportagens/energiaeletrica/energia06.htm>. Acessado em: 23/06/2006.

CÓRDOVA-AGUILAR, M. S., SÁNCHEZ, A., SERRANO-CARREÓN, L., GALINDO, E. Oil and fungal biomass dispersion in a stirred tank containing a simulated fermentation broth. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76(11): 1101 – 1106, 2001.

CORDOVA-LOPEZ, J. ; GUTIERREZ-ROJAS, M. ; HUERTA, S. ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. ; FAVELA-TORRES, E. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques*, 10(1): 1 – 6, 1996.

CORVELEYN, S. and REMON, J. P. Maltodextrins as lyoprotectants in the lyophilization of a model protein, LDH. *Pharm. Res.* 13(1), 146-150, 1996.

COUGHLAN, M. P. AND HAZLEWOOD G.  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 259-289, 1993.

COURI, S. ; TERZI, S.C. ; PINTO, G.A.S. ; FREITAS, S.P. ; COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, 36: 255-61, 2000.

DA SILVA, R. ; FRANCO, C.M.L. ; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. *Boletim da SBCTA*, 31(2): 249 – 260, 1997.

DAHLBERG, L., HOLST O.,KRISTJANSSON, J. K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40(1): 63-68, 1993.

DALLA SANTA, H. S., DALLA SANTA, O. R., BRAND, D., VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:51-60, 2005.

DALSENTER, F.D.H. Contribuição ao Estudo da Aplicação da Proposta Zeri para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico. Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DAMASO, M.C.T. ; ANDRADE, C.M.M.C. ; PEREIRA JR., N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 821 – 835, 2000.

DARLING, D. Cell wall. Endereço eletrônico: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>. Acessado em: 02/11/2006.

DE LOPEZ, S., TISSOT, M., DELMAS, M. Integrated cereal straw valorization by an alkaline pre-extraction of hemicellulose prior to soda-anthraquinone pulping: case study of barley straw. *Biomass and Bioenergy*, 10 (4): 201-211, 1996.

DEKKER, R.F., RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32:277-352, 1976.

DEL BIANCHI, V.L. ; MORAES, I.O. ; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), *Biotecnologia Industrial*, Edgard Blücher Ltda., V.2, p.247-276, 2001.

DESGRANGES, C. ; VERGOIGNAN, C. ; GEORGES, M. ; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 35: 200 – 205, 1991.

DESPHANDE, V., LACHKE, A., MISHRA, C., KESKAR, S., RAO, M. Mode of action and properties of xylanase and, 3-xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1832-1837, 1986.

DURAND, A. (1998), *Solid state fermentation*. *Biofutur* 181, 41–43.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2 –3): 113 – 125, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A Soja no Brasil, 2004. Endereço eletrônico: <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm> Acessado em: 24/06/2006.

ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 31:353-364, 2002.



ESTEBAN, R., CHORDI, A., VILLA, T.G. Some aspects of a 1,4- beta -D-xylanase and a beta-D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26. FEMS Microbiol. Lett. 17: 163-166, 1983.

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

FADEL, M., ABD-EL KADER, M. M. Production of cellulase and b-glucosidase by new isolate of *Aspergillus niger* F-92. Egypt. J. Microbiol. 29 (2): 175-182, 1994.

FAPESP. Propriedades do bagaço da cana-de-açúcar. Revista FAPESP, ed. 30, p.12, 1998.

FENICE, M., SERMANNI, G.G., FEDERICI, F., D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. Journal of Biotechnology, 100: 77 – 85, 2003.

FERNADEZ-ESPINAR M.T., PINAGA, F., DEGRAAFF, L., VISSER, J., RAMON, D. AND VALLES, S. Purification, characterisation and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 555-560, 1994.

FERRAZ, A., CÓRDOVA, A. M., MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of Eucalyptus grandis. Enzyme and Microbial Technology, 32: 59 – 65, 2003.

FNP – FNP Online. Mercado Futuro do Farelo de Soja. Endereço eletrônico: [http://www.agrafnp.com.br/agricultura/soja/mercado\\_futuro\\_farelo.php?PHPSESSID=ee865e651b37a566cc5ff9bb75d5646d](http://www.agrafnp.com.br/agricultura/soja/mercado_futuro_farelo.php?PHPSESSID=ee865e651b37a566cc5ff9bb75d5646d). Acessado em: 03/07/2006.

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In *Water: A Comprehensive Treatise*, vol. 7, ed. Franks, F., Plenum Press, New York, 1982, pp. 215–338.

FREDERICK, M.M., KIANG, C-H., FREDERICK, J.R., REILLY, P.J. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 525-532, 1985.

FREEDONIA – The Freedonia Group Incorporated, 2005. *World Enzymes to 2009*. Endereço eletrônico: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf> Acessado em: 20/06/2006.

GAWANDE P.V. and KAMAT M.Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application, *J. Appl. Microbiol.* 87(4) (1999) 511-519.

GELMI, C., PÉREZ-CORREA, R., AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* and GA<sub>3</sub> production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37: 1033-1040, 2002.

GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3): 85-101, 2003.

GHANEM, N.B., YUSEF, H.H., MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. *Bioresource Technology*, 73: 113 – 121, 2000.

GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., LONSANE, B. K., KARANTH, N. G. Efficient and simple extraction of mouldy bran in a pulsed column extractor for recovery of amyloglucosidase in concentrated form. *Process Biochem.* 26: 235–241, 1991.

GHILDYAL, N.P., GOWTHAMAN, M.K., RAO, R.K.S.M.S., KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-

state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme Microbial Technology*, 16: 253 – 257, 1994.

GHOSE T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59(2): 257-268, 1987.

GOMES, D.J. ; GOMES, J. ; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Biotechnology*, 33: 87 – 94, 1994.

GOMES, I., GOMES, J., STEINER, W. AND ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 701-707, 1992.

GRAJEK, W., GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 9(11): 658-662, 1987.

GUSEK T. W., JOHNSON R. D., TYN M. T., KINSELLA J. E. Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Bioeng.* 37(4): 371-374, 1991.

GUTIERREZ-CORREA, M. ; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters*, 20(1): 45 – 47, 1998.

HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technol.* 58: 137-161, 1996.

HASAN, S.D.M. ; COSTA, J.A.V. ; SANZO, A.V.L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Techniques*, 12(10): 787 – 791, 1998.

HECK, J. X., HERTZ, P. F., AYUB, M. A. Z. Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53. *Process Biochem.* 40 (8): 2891-1895, 2005.

HEIDORNE, F. O., MAGALHÃES, P. O., FERRAZ, A. L., MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. *Enz. Microb. Technol.* 38: 436–442, 2006.

HOQ, M.M., HEMPEL, C., DECKWER, W. D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration, and medium components on production. *J. Biotechnol.* 37(1): 49-58, 1994.

ICIDCA. Manual de derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. 474p.

JANES, R.L. The Chemistry of Wood and Fibres. In: MacDonald and Franklin's Pulp and Paper Manufacture. Vol. I: The Pulping of Wood. McGraw-Hill, New York, 1969.

JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases, 1996. Endereço eletrônico: [http://www2.biotech.wisc.edu/jeffries/xylanase\\_review/xyl\\_rev.html](http://www2.biotech.wisc.edu/jeffries/xylanase_review/xyl_rev.html). Acessado em: 15/06/2006.

JOSELEAU, J. P., COMTAT, J. AND RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In *Xylans and xylanases*, Progress in Biotechnology 7, ed. Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M. A., Voragen A. G. J. Elsevier, New York, 1992, pp. 1-15.

KARNI, M., DEOPURKAR, R. L. AND RALE, V. B.  $\beta$ -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars agricultural residues. World J. Microbiol. Biotechnol., 9:475-478, 1993.

KATO, Y., AND NEVINS, D. J. Isolation and identification of O-(5-Oferuloyl-L arabinofuranosyl)-(1-3)-O-D-xylopyranosyl-(1-3)-xylopyranose as a component of Zea shoot cell walls. Carbohydr. Res. 137:139-150, 1985.

KESKAR, S.S., SRINIVASAN, M.C., DESHPANDE, V.V. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. Biochem. J. 1(1):49–55, 1989.

KHANDEPARKAR, R.D.S., BHOSLE, N.B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. Enz. Microb. Technol. 39(4): 732-742, 2006.

KHASIN, A., ALCHANATI, I., SHOHAM, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59(6): 1725-1730, 1993.

KHENG, P. P., OMAR, I. C. 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 of Science and Technology: 27(2): 325-336, 2005.

KIM, J.H. ; HOSOBUCHI, M. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H. Cellulase Production by a Solid State Culture System. Biotechnology and Bioengineering, 7: 1445 – 1450, 1985

KIMURA, I., SASAHARA, H. AND TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. J. Ferm. Bioeng. 80, 334-339, 1995.

KJELDAHL, J. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. Z. Anal. Chem. 22:366, 1883.

KLUEPFEL, D., DAIGNEAULT, N., MOROSOLI, R., SHARECK, F. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase C) produced by *Streptomyces lividans* 66. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 (5): 626-631, 1992.

KORMELINK, F. J. M., LEEUWEN, M. G. F. S. -L., WOOD, T.M. AND VORAGEN, A.G.J. Purification and characterisation of three endo (1,4)- $\beta$ -xylanases and one  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori*. J. Biotechnol. 27, 249-253, 1993.

KRUSZEWSKA, J., PALAMARCZYK, G., KUBICEK, C.P. Stimulation of exoprotein secretion by choline and Tween 80 in *Trichoderma reesei* QM 9414 correlates with increased activities of dolichol phosphate mannose synthase. Journal of General Microbiology 136:1293-1298, 1990.

LAMIC – Laboratório de análises micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria. Endereço eletrônico: [http://www.lamic.ufsm.br/info\\_aw.html](http://www.lamic.ufsm.br/info_aw.html). Acessado em: 02/11/2006.

LAPPALAINEN A. Purification and characterization of xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Appl. Biochem., 8: 437-448, 1986.

LEKHA, P.K. ; LONSANE, B.K. Biomass Estimation in Solid State Fermentation In: PANDEY, A (Ed.), Solid State Fermentation, Wiley Eastern Limited, India, p.38-48, 1994.

LEMOS J.L.S., FONTES M.C.A. and PEREIRA N.J. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. Appl. Biochem. Biotechnol. 91: 681-689, 2001.

LI, K., AZADI, P., COLLINS, R., TOLAN, J., KIM, J. S. AND ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. Enzyme and Microbial Technology 27: 89-94, 2000.

LINEWEAVER, H. AND BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56: 658–666, 1934.

LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. Enzyme and Microbial Technology 7: 258 – 265, 1985.

LONSANE, B.K., SAUCEDO-CASTANEDA, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZALES, G., GHILDYAL, N.P., RAMAKRISHMA, M., KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. Process Biochemistry, 26: 1 – 15, 1991.

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A L. ; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265 – 275, 1951.

LSBU – London South Bank University. Effect of temperature and pressure, 2004. Endereço eletrônico: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/temperature.html>. Acessado em: 04/07/2006.

LU, M.Y., MADDIX, I.S., BROOKS, J.D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, 33(2): 117 – 123, 1998.

LU, M.Y., MADDIX, I.S., BROOKS, J.D. Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* in Solid-Substrate Fermentation. Bioresource Technology, 54: 235 – 239, 1995.

LU, W., LI, D., WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale fermentation by *Aspergillus sulphureus*. Enzyme and Microbial Technology, 32: 305 – 311, 2003.

MAGEE, R.J., KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 32:61-93, 1985.

MARUI, M., NAKANISHI, K., YASUI, T. Chemical modification of xylanases from *Streptomyces sp.* Biosci., Biotechnol., Biochem. 57(4): 662-663, 1993.

MELLO JUNIOR, C.A., COSTA, L.R.O., MACHADO, P.F., d'ARCE, R.D., MATTOS, W.R.S. Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação *in vitro* e digestibilidade *in vivo*. Livestock Research for Rural Development, 1(1), 1989. Endereço eletrônico: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/brazil.htm>. Acessado em: 20/06/2006.

MILAGRES, A M. F. Produção de Xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpas kraft. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, 1994.

MILAGRES, A.M.F., LACIS, L.S., PRADE, R.A. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. Enz. Microb. Technol. 15:248-253, 1993.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428, 1959.

MITARD, A., RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. Biotechnol. Bioeng. 32:835-840, 1988.

MOO-YOUNG, M. ; MOREIRA, A. R. ; TENGARDY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, D.E. ; BERRY, D.R. KRISTIANSEN, B. (Eds). The filamentous fungi. V.4, p. 117, 1983.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation. In: DEMAIN, A.L. ; SOLOMON, N.A. (Eds.) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.



NARAHARA, H., KOYAMA, Y., YOSHIDA, T., PICHANGKURA, S., UEDA, R., TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. J. Ferm. Technol., 60(4): 311 – 319, 1982.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. J. Basic Microbiol. 34: 405 – 414, 1994.

NISHITANI, K., NEVINS, D. J. Enzymic Analysis of Feruloylated Arabinoxylans (Feraxan) Derived from *Zea mays* Cell Walls I: Purification of Novel Enzymes Capable of Dissociating Feraxan Fragments from *Zea mays* Coleoptile Cell Wall. Plant Physiol. 87(4):883-890, 1988.

NSEREKO, V.L., MORGAVI, D.P., RODE, L.M., BEAUCHEMIN, K.A., McALLISTER, T.A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. Animal Feed Science and Technology, 88: 153 – 170, 2000.

NWE, N., CHANDRKRACHANG, S., STEVENS, W.F., MAW, T., TAN, T.K., KHOR, E., WONG, S.M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. Carbohydrate Polymers, 49(2): 235 – 237, 2002.

ONYSKO, K. A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. Biotechnol. Adv. 11(2):179-98, 1993.

OOIJKAAS, L.P., TRAMPER, J., BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 22: 480 – 486, 1998.

ORIOLE, E. ; SCHETTINO, B. ; VINEGRA-GONZALES, G. ; RAIMBAULT, M. Solid-state Culture of *Aspergillus niger* on Support. Journal of Fermentation Technology, 66(1): 57 – 62, 1988.

PALMA, M.B., MILAGRES, A.M.F., PRATA, A.M.R., MANCILHA, I.M. Influence of Aeration and Agitation Rate on the Xylanase Activity from *Penicillium janthinellum*. Process Biochemistry, 31(2): 141 – 145, 1996.

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

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., ASHAKUMARY, L.. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. Process Biochemistry 31(1): 43 – 46, 1996.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35: 1153 – 1169, 2000a.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 13(2-3): 81 – 84, 2003.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R. and NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. Bioresource technology, 77 (1): 149-162, 1999.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEÓN, J. A. AND NIGAM, P. Production of organic acids by solid-state fermentation. In: Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech Publishers, New Delhi, 113-126, 2001.

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58(6): 761-766, 2002.

POLINUTRI – Poli-Nutri Alimentos LTDA. Farelo de Soja: processamento e qualidade, 2001. Endereço eletrônico: [http://www.polinutri.com.br/conteudo\\_artigos\\_antteriores\\_janeiro.htm](http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_antteriores_janeiro.htm). Acessado em: 25/06/2006.

PORTARIA nº 795 de 15/12/93. Endereço eletrônico:  
[http://www.pr.gov.br/claspar/pdf/farelosoja795\\_93.pdf](http://www.pr.gov.br/claspar/pdf/farelosoja795_93.pdf). Acessado em: 27/06/2006.

PRASERTSAN, P., H-KITTIKUL, A., KUNGHAE, A., MANEESRI, J., OI, S. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. World J. Microbiol. Biotechnol. 13: 555-559, 1997.

QADEER, M. A., ANJUM, J. I., AKHTAR, R. Biosynthesis of enzymes by solid substrate fermentation. Part II: Production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. Pak. J. Sci. Ind. Res. 23: 25-29, 1980.

QUERIDO, A. L. S., COELHO, J. L. C., ARAÚJO, E. F., CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. Braz. Arch. Biol. Technol. 49(3): 475-480, 2006.

RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. AND LONSANE, B. K. Solid state fermentation at ORSTOM: History, evolution and perspectives. In: Advances in solid substrate fermentation. Kluwer Acad. Pub. pp. 577-612, 1997.

RAMAKRISHNA, S. V., SUSEELA, L. T., GHILDYAL, N. P., JALEEL, S. A., PREMA, P., LONSANE, B. K., AHMED, S. Y. Recovery of amyloglucosidase from moldy bran. Indian J. Technol. 20: 476-480, 1982.

RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAO, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: Advances in Applied Microbiology, 38: 99 – 147, 1993.

RAO, M., SEETA, R., DESHPAND, V. Effect at pretreatment of cellulose by *Penicillium funiculosum* and recovery of enzyme. Biotechnol. Bioeng. 25: 1863-1867, 1983.

REILLY, P J. The conversion of agricultural by-products to sugars: final report. Ames, Engineering Research Institute, Iowa State University, 199 p., 1981.

REIS, S., COSTA, M. A. F., PERALTA, R. M. Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. Acta Scientiarum: Biological Sciences 25(1): 221-225, 2003.

REZENDE, M. I., BARBOSA, A. M., VASCONCELOS, A. F. D., ENDO, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. Brazilian J. Microbiol. 33: 67-72, 2002.

RIDDER, E.R., NOKES, S.E., KNUTSON, B.L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. American Society of Agricultural Engineers, 42(6): 1785 – 1790, 1999.

RODRIGUEZ-LEÓN, J. A., SASTRE, L., ECHEVARRIA, J., DELGADO, G. AND BECHSTEDT, W. A mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation. Acta Biotechnol., 8, 307-310, 1988.

ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K. Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. Biotechnol. Techniques 6(5):429-432, 1992.

RUEGGER, M.J.S. Atividade enzimática e produção de ácido  $\gamma$ -Linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, SP, 2001.

SALEH, F., OHTSUKA, A., TANAKA, T., HAYASHI, K. Effect of enzymes of microbial origin on in vitro digestibilities of dry matter and crude protein in soybean meal. Animal Science Journal 74: 23, 2003.

SAMBORSKA, K., GUIAVARC'H, Y., VAN LOEY, A., HENDRICKX, M. The influence of moisture content on the thermostability of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. Enzyme microb. technol. 37(2): 167-174, 2005.

SANTOS. E. dos. Produção de Xilanase por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 em Cultivo Semi-Sólido Utilizando Bagaço de Cana-de-Açúcar. Dissertação de Mestrado, FAENQUIL, Lorena, SP, 2001.

SA-PEREIRA P., PAVEIA H., COSTA-FERREIRA M., AIRES-BARROS M. A new look at xylanases: an overview of purification strategies, *Mol. Biotechnol.* 24(3) (2003) 257-81.

SATO, K. ; NAGATANI, M. ; NAKAMURA, K. ; SATO, S. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid State Culture with Forced Aeration. *Journal Of Fermentation Technology*, 61(6): 623 – 629, 1983.

SCHWADORF, K., MULLER, HM. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(3):457-62, 1989.

SCOTTI, C.T. ; VERGOIGNAN, C. ; FERON, G. ; DURAND, A Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 7: 1 – 5, 2001.

SEITZ, L. M.; MOHR, H. E.; BURROUGHS, R.;SAUER, D. B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 54, n. 6, p. 1207-1217, 1977.

SHAH, A. R., MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.* 40, 1763-1771, 2005.

SILVA, A.G. Algodão, amendoim e soja. In: Simpósio sobre nutrição de bovinos, Piracicaba: FEALQ, Piracicaba, SP, 6: 47-72, 1995.

SILVA, W. O. B., MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* 40: 321-326, 2005.

SINGH, S. A., RAMAKRISHNA, M., RAO, A. G. A. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochem* 35: 411–417, 1999.

SMITH, D. C., BHAT, K. M. AND WOOD, T. M. Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 4(7): 475-484, 1991.

SMITH, D. C., WOOD, T. M. Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and  $\beta$ -xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnology and Bioengineering* 38 (8): 883 – 890, 2004.

SMITS, J.P. ; RINZEMA, A. ; TRAMPER, J. ; VAN SONSBEK, H.M. ; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 46: 489 – 498, 1996.

SOCCOL, C. R. Developpement de bioprocedés pour la valorization post-recolt de produits et sous produits agricoles tropicaux. Memoire (Présente en vue de l'Habilitation à Diriger des Recherches). Université de Provence. Marseille, 2001.

SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J-M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 41: 330 – 336, 1994.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 205 – 218, 2003.

SOMOGYI M. Notes on sugar determination, *J Biol Chem.* 95 (1952) 18–23.

SOUZA, D.F., SOUZA, C. G. M., PERALTA, R.M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 36: 835 – 838, 2001.

SOUZA, M.C.O., ROBERTO, I.C., MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 768 – 772, 1999.

SOUZA, T. C., FERREIRA, C. A., BRANDÃO, P. C., HORI, C. E., ROMANIELO, L. L. Avaliação do uso de biomassa como adsorvente para a separação de contaminantes orgânicos em efluentes líquidos. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, FEQ, UNICAMP, 2005.

SPIER M. R., WOICIECHOWSKI, A. L., VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. *International Journal of Food Engineering* 2(3): 1-20, 2006.

SRINIVASAN M. C. E RELE M. V. Microbial xylanases for paper industry. Endereço eletrônico: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles21.htm>. Acessado em: 20/10/2006.

SUBRAMANIYAN, S. and PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Letts.* 183, 1-20, 2000.

SUGAMA, S., OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. *Journal of Fermentation Technology*, 57(5): 408 – 412, 1979.

TAHIR, M., SALEH, F., OHTSUKA, A., HAYASHI, K.. Synergistic effect of cellulase and hemicellulase on nutrient utilization and performance in broilers fed a corn–soybean meal diet. *Animal Science Journal* 76:6, 559-565, 2005.

TAN, L.U.L., MAYERS, P., SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can. J. Microbiol. 33: 689-692, 1987.

TEATHER, R.M., WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43, 777– 780, 1982.

TEN, L.N., IMA, W-T., KANGA, M-K.M.S., LEEA, S-T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. J. Microbiol. Methods 56: 375– 382, 2004.

TENKANEN, M., PULS, J., POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microb. Technol. 14 (7): 566-574, 1992.

UCHINO, F., NAKANE, T. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 24(5): 1121-1127, 1981.

ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Endereço eletrônico: [http://www.unica.com.br/pages/agroindustria\\_alta.asp](http://www.unica.com.br/pages/agroindustria_alta.asp). Acessado em: 23/06/2006.

VAN DER BROECK, H. C., DE GRAAFF, L. L., HILLE, J. D. R., VAN OOYEN, A. J. J. AND HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper products. Eur. Pat. Appl. 90:202-220, 1990.

VANDENBERGHE, L.P.S. ; SOCCOL, C.R. ; PANDEY, A ; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 74: 175 – 178, 2000.

WARD, K. R., ADAMS, G. D. J., ALPAR, H. O., IRWIN, W. J. Protection of the enzyme L- asparaginase during lyophilisation – a molecular modeling approach to predict required level of lyoprotectant. Int. J. Pharm. 187: 153-162, 1999.



WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J. AND WONG, D.W.S. Handbook of Food Enzymology. 1.128 pp., 2002.

WIACEK-ZYCHLINSKA, A., CZAKAJ, J. AND SAWICKA-ZUKOWSKA R. (1994), Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentations. *Bioresource Technol.*, 49(1), 13-16.

WONG, K.K.Y. ; TAN, L.U.L. ; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, 52(3): 305 – 317, 1988.

WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. In: *Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Cap. 2:9 – 30, 1984.

YANG, X. ; CHEN, H. ; GAO, H. ; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 78: 277-80, 2001.

YASUI, T., MARUI, M., KUSAKABE, I., NAKANISHI, K. Xylanases of *Streptomyces*. *Methods Enzymol.* 160: 648-654, 1988.

ZHENG, L., DU, Y., ZHANG J. Biobleaching effect of xylanase preparation from an alkalophilic *Bacillus sp.* on ramie fibers. *Biotechnol. Lett.* 22: 1363-1367, 2000.

ZHENG, Z. ; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, 35: 825 – 830, 2000.

