



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre

Fernanda Pereira Lopes
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Francisco Maugeri Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP
Março de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L881o Lopes, Fernanda Pereira
 Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre /
 Fernanda Pereira Lopes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

 Orientador: Francisco Maugeri Filho
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

 1. Xilanase. 2. Leveduras. 3. Otimização. 4. Planejamento
 experimental. 5. Xilana. I. Maugeri Filho, Francisco. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
 Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Optimization of xylanase production from wild yeast

Palavras-chave em inglês (Keywords): Xylanase, Yeasts, Optimization, Experimental design,
Xylan

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Fátima Aparecida de Almeida Costa

Saartje Hernalsteens

Data de defesa: 16/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Orientador – FEA/UNICAMP

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa

Membro – FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Saartje Hernalsteens

Membro – Depto. de Ciências Exatas e da Terra/UNIFESP

*“A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido
e não na vitória propriamente dita.”*
(Mahatma Gandhi)

Aos meus pais, Luiz e Marina,
aos meus irmãos, Lu e Cris,
e aos meus amores, Felipe e Murilo,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me dá proteção e saúde para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, que me estimularam a continuar e me deram o apoio que eu precisava para concluir esta etapa. Muito obrigada por tudo que me ensinaram! Devo muito a vocês.

Ao Felipe, responsável pelo meu equilíbrio, que sem dúvida é o principal responsável por muitas das minhas conquistas. Obrigada pela dedicação, pelo incentivo, pelas aulas de integrações e derivadas e, sobretudo, pela paciência e compreensão.

Ao meu filho, Murilo, que desperta em mim uma vontade de buscar sempre mais e que me presenteia com um sorriso depois de um longo dia de trabalho. Você esteve comigo em cada prova, compartilhou noites de estudo e me fez perceber que a vida faz muito mais sentido quando um filho faz parte dela.

Ao Lu e à Cris, nos quais procuro me espelhar e mostrar a eles o orgulho que sinto em tê-los como irmãos.

Ao Professor Francisco Maugeri pela orientação, incentivo, confiança, calma e, sobretudo, pela compreensão.

Aos professores que participaram da banca examinadora e pelas valiosas correções, contribuições e sugestões.

À Professora Maria Isabel Rodrigues pelo apoio e pelo conhecimento que transmitiu, tornando possível o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

À Fifa que, com sua calma e generosidade, tornou esse trabalho mais ameno e prazeroso, e que tanto contribui com suas sugestões e sua experiência.

À Jajá e ao César, pela amizade incondicional dedicada durante todos esses anos e pelo ambiente familiar que criaram aqui em Campinas.

Aos amigos Geraldo, Remi, Abraão, Raquel, Andrea, Mónica e Marcus, do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pelas idéias, cooperação e pelo agradável ambiente de trabalho. E às grandes amigas Ana Paula, Elizama e Rosana, que não pouparam esforços para me ajudar no desenvolvimento deste trabalho e com as quais dividi muitas das minhas horas de descontração no laboratório.

À Nenis, por ter transmitido tanto carinho e esperança nos momentos de fragilidade, guardando sempre um sorriso para comemorar a superação.

Aos técnicos e professores da FEA, aos funcionários de secretaria e ao pessoal da limpeza.

SUMÁRIO

Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Triagem de microorganismos	3
2.2. Leveduras.....	4
2.2.1. Armazenamento de leveduras em laboratório	4
2.3. Hemiceluloses.....	5
2.3.1. Xilana	6
2.4. Enzimas Microbianas.....	7
2.4.1. Xilanases.....	8
2.4.2. Endo-(1,4)- β -xilanases	10
2.5. Produção de xilanases.....	11
2.6. Potenciais biotecnológicos das xilanases.....	12
2.7. Aplicações de xilanases	14
2.8. Fatores que influenciam na produção de xilanases.....	16
2.8.1. pH e temperatura	16
2.8.2. Composição do meio	16
2.9. Planejamento Experimental	17
2.9.1. Delineamento Plackett & Burman.....	18
2.9.2.1. Adição de pontos centrais	19
2.9.2.2. Adição de pontos axiais	19
3. OBJETIVOS	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Seleção da cepa produtora de xilanase.....	22
4.1.1. Microrganismos utilizados	22
4.1.2. Fermentação em meio líquido enriquecido	22
4.2. Metodologia analítica.....	24

4.2.1.	Determinação da atividade da xilanase	24
4.2.2.	Curva padrão da quantidade de açúcar redutor	24
4.2.3.	Determinação de Massa seca.....	25
4.2.4.	Determinação de pH.....	25
4.3.	Estudo da influência do tampão fosfato.....	25
4.4.	Planejamento Experimental	26
4.4.1.	Delineamento Plackett & Burman.....	26
4.4.2.	Delineamento Composto Central Rotacional	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1.	Seleção da cepa produtora de xilanase.....	31
5.2.	Estudo da influência do tampão fosfato.....	35
5.3.	Planejamento Experimental	38
5.3.1.	Delineamento Plackett & Burman.....	39
5.3.2.	Delineamento Composto Central Rotacional	48
6.	CONCLUSÃO	65
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal, incluindo a hemicelulose.	6
Figura 2. Estrutura da xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas.	9
Figura 3. Especificidade da xilanase.	10
Figura 4. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática obtidos para a cepa AY10 <i>versus</i> o tempo de fermentação.	33
Figura 5. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática obtidos para a cepa AAD5 <i>versus</i> o tempo de fermentação.	34
Figura 6. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática <i>versus</i> tempo de fermentação utilizando meio sem tampão fosfato.	37
Figura 7. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática <i>versus</i> tempo de fermentação utilizando meio com tampão fosfato.	37
Figura 8. Gráfico da evolução do pH em função do tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.	41
Figura 9. Gráfico da evolução da biomassa em função do tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.	43
Figura 10. Gráfico da atividade <i>versus</i> o tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.	45
Figura 11. Gráfico do pH <i>versus</i> o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.	50
Figura 12. Gráfico da biomassa <i>versus</i> o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.	52
Figura 13. Gráfico da atividade <i>versus</i> o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.	54
Figura 14. Valores experimentais de atividade em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.	59
Figura 15. Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade.	60
Figura 16. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da xilanase em função da concentração de xilana e da temperatura.	61

Figura 17. Curvas de pH, biomassa e atividade enzimática em função do tempo de fermentação para as três repetições dos na condição do ponto central. 64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores de α em função de k.....	20
Tabela 2. Composição do meio sintético enriquecido.....	22
Tabela 3. Composição do meio GYMP.....	23
Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para análise da influência do tampão fosfato sobre a produção da xilanase.....	26
Tabela 5. Variáveis consideradas no delineamento Plackett & Burman e níveis utilizados....	27
Tabela 6. Matriz dos valores codificados e reais do delineamento Plackett & Burman realizado.	28
Tabela 7. Matriz codificada do DCCR 2 ² realizado.	29
Tabela 8. Variáveis consideradas no DCCR e níveis utilizados.....	29
Tabela 9. Valores de pH, biomassa e atividade encontrados para a cepa AY ₁₀	32
Tabela 10. Valores de pH, biomassa e atividade enzimáticas para a cepa AAD ₅	32
Tabela 11. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática para a cepa AY ₁₀ em fermentação utilizando meio de cultura enriquecido contendo tampão fosfato.	35
Tabela 12. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática para a cepa AY ₁₀ em fermentação utilizando de cultura enriquecido sem tampão fosfato.	36
Tabela 13. Valores de pH encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.	40
Tabela 14. Valores de biomassa encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.	42
Tabela 15. Valores de atividade encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.	44
Tabela 16. Matriz com os valores codificados do delineamento Plackett & Burman e as respostas obtidas.	46
Tabela 17. Matriz com os valores reais do delineamento Plackett & Burman e as respostas obtidas.....	47
Tabela 18. Resultados dos efeitos do delineamento Plackett & Burman.	48

Tabela 19. Valores de pH encontrados para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.....	49
Tabela 20. Valores de biomassa encontrados para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.....	51
Tabela 21. Valores de atividade enzimática para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.....	53
Tabela 22. Matriz real e codificada do DCCR e as respostas obtidas.....	55
Tabela 23. Coeficientes de regressão obtidos a partir do erro residual para valores codificados do DCCR.....	56
Tabela 24. Coeficientes de regressão considerando somente os termos a $p < 0,05$	56
Tabela 25. ANOVA para a atividade enzimática considerando todos os termos do modelo...	57
Tabela 26. ANOVA para a atividade enzimática considerando somente os termos estatisticamente significativos (p -valor $< 0,05$).....	58
Tabela 27. Resultados experimentais para os 11 ensaios e as respostas previstas utilizando o modelo e seus desvios.	58
Tabela 28. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática em função do tempo de fermentação para as três repetições dos na condição do ponto central.	62
Tabela 29. Comparação da produção de xilanase por fungos.	63

RESUMO

O interesse no estudo dos sistemas das xilanases vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos. Estas enzimas podem ser aplicadas em indústrias de panificação, melhorando a textura, o volume da massa e o tempo de prateleira dos produtos; em vinícolas e cervejarias, favorecendo a etapa de filtração e a clarificação, além de ser adicionada à ração animal de aves e suínos para aumentar a digestibilidade. Diante da importância da aplicação das xilanases e da necessidade desenvolver condições que otimizem a produção dessas enzimas a fim de tornar sua utilização comercial menos restrita, estudos têm sido realizados visando obter maior produtividade e substratos de baixo custo. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de xilanase a partir de uma cepa de levedura silvestre isolada da Mata Atlântica utilizada em estudo anterior, indicando potencial para produção de uma enzima estável. Duas cepas foram testadas inicialmente a fim de selecionar a mais adequada para este estudo. Uma vez selecionada, a cepa foi utilizada para testar a influência do tampão fosfato sobre a produção de xilanase e os resultados mostraram que a adição de tampão fosfato ao meio de cultura exerce um efeito negativo tanto em relação à biomassa da levedura quanto à produção e atividade da enzima. A partir desses resultados optou-se pela exclusão do tampão do meio e foi aplicado um planejamento experimental variando as condições de fermentação visando a otimização da produção da xilanase. Primeiramente, realizou-se um delineamento Plackett & Burman (PB) para determinar os efeitos principais das sete variáveis estudadas em relação à atividade enzimática, onde a temperatura e a concentração de xilanase foram consideradas estatisticamente significativas. Em seguida, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 11 ensaios onde as variáveis independentes foram aquelas consideradas significativas pelo PB. Os resultados obtidos pelos DCCR foram analisados por ferramentas estatísticas que confirmaram a confiabilidade do modelo preditivo para a atividade da enzima xilanase. De acordo com este modelo, a máxima atividade enzimática (67,45 UI) foi encontrada para os pontos centrais do planejamento, onde a concentração de xilana foi de 20 g.L⁻¹ e a temperatura de 30°C.

ABSTRACT

The interest in the study of systems of xylanases has been stimulated by its usefulness in a variety of biotechnological processes. These enzymes could be applied to bakery, improving texture, volume and mass of the shelf life of products, wineries and breweries, supporting the step of filtration and clarification; also it could be added in poultry and pigs feed to increase digestibility. Due to this importance of application of xylanases and the necessity to develop conditions that optimize the production of these enzymes in order to make its commercial use less restricted, studies have been done to achieve higher productivity with low cost substrates. The objective of this work was to optimize the production of xylanase from a wild yeast strain isolated from Mata Atlântica. Two strains were tested initially in order to select the most appropriated one for this study. Once selected, it was tested the influence of phosphate buffer on the production of xylanase and the results showed that the addition of phosphate buffer to the culture medium has a negative effect on yeast biomass and activity enzyme produced. From these results it was decided to exclude the buffer used in medium and it was applied an experimental design aimed to optimize the conditions for xylanase production. At first, a design Plackett & Burman (PB) was done to determine the main effects of each variable studied in relation to enzymatic activity, where the temperature and the concentration of xylanase were considered statistically significant. Then, a central composite rotational design (DCCR) of 11 trials was carried out, where the independent variables were those considered significant by the PB. The results obtained by DCCR were analyzed by statistical tools that confirmed the reliability of the predict model to the xylanase activity enzyme. According to this model, the maximum enzyme activity (67,45 UI) was found at the central points of planning, where the concentration of xylan was 20 gL^{-1} and temperature of $30 \text{ }^\circ \text{C}$.

1. INTRODUÇÃO

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, os quais podem ser obtidos a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil.

Atualmente, há um grande interesse em encontrar espécies de microrganismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral e à de alimentos em particular, bem como otimizar processos de produção desses insumos a partir de microrganismos já conhecidos (HERNALSTEENS, 2006).

As enzimas representam um dos principais produtos de processos biotecnológicos, as quais são produzidas comercialmente, principalmente a partir de microrganismos, devido 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, podendo contribuir para o branqueamento de polpas de celulose, clarificação de sucos e vinhos, além de melhorar a digestibilidade e o valor nutricional da ração animal.

O desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias visando a produção de xilanases com características bioquímicas adequadas à aplicação industrial tem sido o objetivo de muitos trabalhos. Além disso, a necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Dentre as vantagens do planejamento experimental, encontram-se: 1) Os fatores são analisados simultaneamente. Assim, podemos verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; 2) É possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo. Podemos maximizar variáveis como rendimento, produtividade e pureza, e/ou minimizar as variáveis custo e contaminação, entre outras, individual ou simultaneamente.

Considerando o crescente interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos com maior produtividade e o potencial das xilanases, desenvolveu-se este trabalho a fim de estudar os fatores capazes de influenciar a produção e atividade desta enzima. Este estudo foi viabilizado pela utilização de um planejamento experimental constituído de duas etapas e teve como microrganismo produtor da enzima uma cepa de levedura silvestre isolada da Mata Atlântica que se encontra estocada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Triagem de microorganismos*

Estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. Por isso, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera, os microrganismos foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006).

No entanto, o crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia tem estimulado a descoberta de novos microrganismos a fim de aumentar a produtividade, a especificidade e a estabilidade das enzimas (GEOK *et al.*, 2003). Além disso, há uma crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatas do uso dos recursos naturais do planeta, o que vem impulsionando o avanço dos processos biotecnológicos (ZANOTTO *et al.*, 2007).

A seleção de cepas selvagens hiperprodutoras é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE E CASTILHO, 2000). Vários microrganismos são capazes de sintetizar enzimas e a triagem desses microrganismos está diretamente relacionada ao descobrimento de novas enzimas, mais estáveis e seletivas, podendo ser usadas para biocatálise e sínteses orgânicas (CARDERNAS *et al.*, 2001; SANDOVAL & MARTY, 2007).

Microrganismos produtores de enzimas são encontrados em diversos habitats, como em rejeitos de indústrias de processo de óleos vegetais e de laticínios, solos, sementes, frutos e alimentos apodrecidos (SHARMA *et al.*, 2001). O solo possui uma grande diversidade de populações microbianas de onde se podem isolar estes microrganismos e avaliar a sua capacidade para a produção enzimática (KO, WANG E ANN, 2005).

2.2. Leveduras

Desde o milênio passado as leveduras são utilizadas pelo homem na produção de diversos tipos de alimentos, como por exemplo, no crescimento de pães e produção de bebidas, as quais continham álcool etílico, provavelmente, o primeiro anestésico. Recentemente estas vêm sendo utilizadas na indústria para a produção de compostos químicos, combustíveis entre outros (ROSE & HARRISON, 1987).

Leveduras são fungos com variada distribuição no ecossistema. Diferenciam-se dos bolores por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente em relação aos bolores. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, devido à sua maior relação área/volume (JAY, 1992).

São capazes de crescer dentro de amplos intervalos de pH ácido e em concentrações de etanol de até 18%. Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55 a 60% e produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro ao vermelho, passando pelo rosa (JAY, 1992).

As leveduras têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais (KIRSOP & KURTZMAN, 1988; TORNAI-LEHOCZKI *et al.*, 2003). São microrganismos versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais. Identificar leveduras de forma rápida e confiável pode ser importante na indústria, para estabelecer precisamente as causas de contaminação indesejada, e na medicina, para o diagnóstico de certas doenças. Uma identificação rápida em certos contextos também pode ser crucial, como por exemplo, quando uma determinada levedura está sendo utilizada industrialmente ou em experimentos de laboratório (BARNETT, 1990).

2.2.1. Armazenamento de leveduras em laboratório

Sendo a decomposição e a morte de materiais biológicos inerentes ao seres vivos, as estruturas e funções dos organismos irão mudar e se perder com o tempo, assim como ocorre em culturas mantidas em laboratório ou quando tais organismos são manipulados. Por isso, tentativas de interromper o processo biológico natural têm sido o alvo de muitos pesquisadores e muitos esquemas de preservação de culturas puras estão sendo testados,

utilizando-se principalmente a água e a temperatura. O potencial de estocagem de células vivas, por longos períodos, rapidamente se tornou alvo de estudos em diversas áreas, para preservação de muitos tipos de organelas, células, tecidos e órgãos (MCLELLAN & DAY, 1995).

A manutenção de culturas de microrganismos em laboratório implica não só na manutenção de sua viabilidade, mas é de fundamental importância a preservação de suas características metabólicas, com recuperação rápida de sua taxa de crescimento e reprodução, para fins industriais, de estudos e pesquisas (HAWKSWORTH, 2002).

Neste trabalho, foram utilizadas leveduras silvestres isoladas de diversas regiões do Brasil que foram estocadas em criotubos a -80°C , garantindo a manutenção de suas características e preservação da viabilidade celular. Tais leveduras vêm sendo envolvidas em pesquisas com finalidades diversas, especialmente produção de enzimas de interesse comercial, o que reforça a necessidade de estocagem de microrganismos em laboratórios por meio de técnicas que assegurem a preservação destes.

2.3. *Hemiceluloses*

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 1).

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 β (1,4) entre os seus componentes, exceto as que possuem galactose, cuja ligação é do tipo β (1,3) (MAGEE & KOSARIC, 1985).

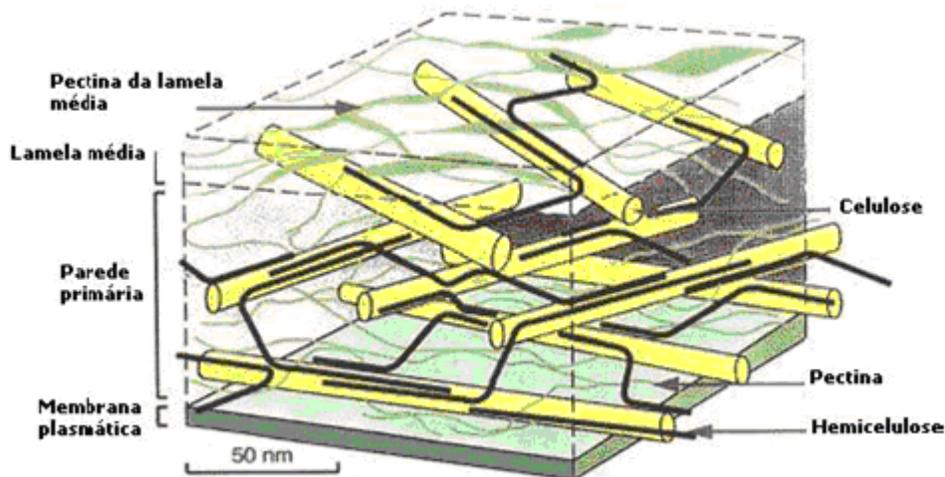


Figura 1. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal, incluindo a hemicelulose.
Fonte: DARLING, 2006.

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 al*, 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 al*, 1997).

2.3.1. Xilana

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolissacarídeo composto de ligações β -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 α -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. Enzimas Microbianas

Dentro da indústria de alimentos, as enzimas são particularmente úteis quando uma transformação específica é requerida. Estas são muito utilizadas para produção de ingredientes e modificação de textura (JOHSON-GREEN, 2002).

Na maioria dos processos enzimáticos, enzimas microbianas são mais utilizadas, porque são mais fáceis e baratas de serem obtidas. Uma das razões para isso é que muitas bactérias e fungos têm habilidade natural de secretar enzimas e crescer em meios com baixo custo. Outra razão para o uso de microrganismos é que muitos deles possuem uma longa história de aplicação segura na indústria de alimentos (JOHSON-GREEN, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003).

As vantagens do emprego de enzimas microbianas em processos industriais devem-se, sobretudo, (1) à existência de diferentes tipos de atividade enzimática, (2) à rapidez e estabilidade de produção através de fermentação microbiana de baixo custo, reprodutível e segura, e (3) às otimizações no rendimento que são obtidas muito mais

facilmente com a engenharia genética ou de proteínas do que a partir de culturas de plantas ou animais. Além disso, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como “Generally Recognized as Safe - GRAS” (LEE, 1997; CARVALHO *et al.*, 2005).

2.4.1. Xilanases

Xilanases são glicosidades responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -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 microbianas específicas. A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo β -1,4 xilanase (COUGHLAN & HAZLEWOOD, 1993).

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, 2006).

A endo β -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 β -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 (β -xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolases), como mostra a Figura 2, 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 α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase, respectivamente. Portanto, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -1,4 xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase).

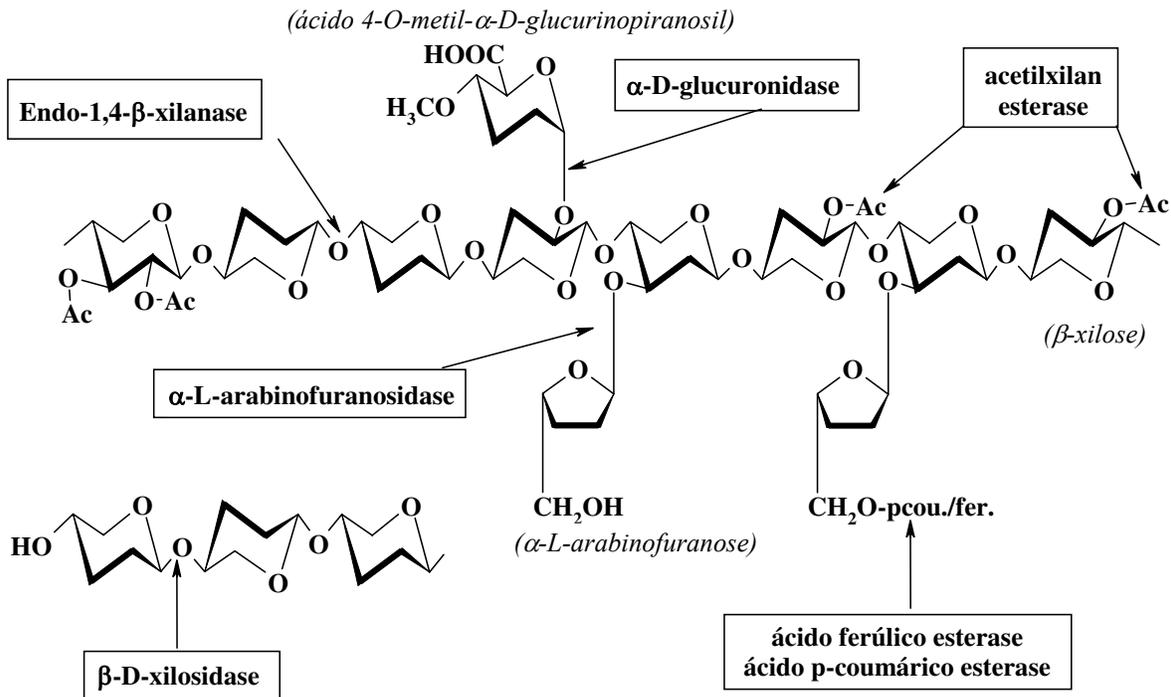


Figura 2. Estrutura da xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas.

Uma teoria geralmente aceita a respeito da regulação da síntese de enzimas degradadoras de substâncias poliméricas é que baixas concentrações de hidrolases são continuamente produzidas e excretadas. Com a liberação destas hidrolases ocorre a hidrólise do polissacarídeo e as pequenas partículas formadas penetram na célula induzindo-a a produzir maiores quantidades da enzima. A Figura 3 ilustra a atuação da enzima endo-1,4- β -xilanase de acordo com a sua especificidade.

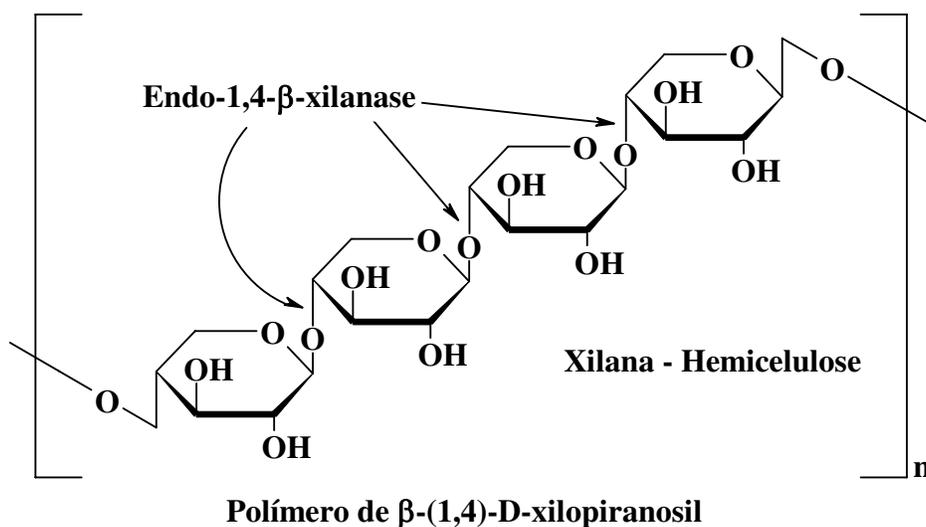


Figura 3. Especificidade da xilanase.

2.4.2. *Endo-(1,4)- β -xilanases*

Endo-(1,4)- β -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, β -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).

2.5. *Produção de xilanases*

Um dos principais fatores para a eficiente produção das xilanases é a escolha de um substrato indutor apropriado. A produção seletiva de xilanase é possível no caso de espécies *Trichodenna* e *Aspergillus*, usando somente xilana como fonte de carbono. Em celulose, esses microrganismos produzem celulase e xilanase, que pode ser devido a traços de hemiceluloses presentes no substrato celulósico (KULKARNI *et al.*, 1999).

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.

Substratos hemicelulósicos de baixo custo, como sabugo de milho, talo de milho, farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de cana, farelo ou palha de arroz têm sido adequados para a produção de xilanases no caso de certos microrganismos, tais como, *Aspergillus tamarri* (KADOWAKI *et al.*, 1997), *Auerobmidium pullulans* (KARNI *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (KUHAD *et al.*, 1998), *Melanocarpus albomyces* (JAIN, 1995), *Termomyces lanuginosus* (PUCHART *et al.*, 1999) e *Bacillus* sp (GESSESSE & MAMO, 1999), *Clostridium absonum* (RANI & NAND, 2000), *Sfreptomyces cuspidosporus* (MAHESWARI & CHANDRA, 2009), *Streptomyces* sp (TECHAPUN *et al.*, 2002). Embora numerosas espécies produtoras de xilanase tenham sido descritas, a produção comercial é restrita (TECHAPUN *et al.*, 2003, HALTRICH *et al.*, 1996). Entretanto, o cenário futuro pode ser diferente, devido as várias espécies promissoras relatadas e que produzem xilanase com alto rendimento e com maior estabilidade em condições extremas de pH e temperatura (TECHAPUN *et al.*, 2003).

Quando a fermentação da xilanase é realizada em substratos complexos, vários fatores atuam de modo combinado ao nível da expressão enzimática. Dentre estes fatores

encontram-se a acessibilidade ao substrato, a taxa e a quantidade de liberação dos xilooligossacarídeos e da xilose (KULKARNI *et al.*, 1999). Em muitos casos, açúcares facilmente metabolizáveis, tal como glicose ou xilose, são supressores da síntese de xilanase. Assim a regulação da secreção de xilanase pelos microrganismos ainda não é completamente entendida.

Desde que a xilana não é capaz de entrar na célula microbiana, a indução de xilanase é estimulada pelos fragmentos da xilana de baixa massa molar, que são produzidos no meio pela pequena quantidade de enzimas constitutivas produzidas (BEG *et al.*, 2001). As xilanases ligam-se fortemente ao substrato, dessa forma, uma parte da enzima produzida durante a fermentação é frequentemente perdida e descartada como enzima ligada, juntamente com o substrato insolúvel. As enzimas metabólicas do produtor de xilanase, tais como proteases também afetam o rendimento da enzima. Estas enzimas são expressas otimamente no final da fase exponencial, portanto o tempo do término da fermentação deve ser correlacionado com a produção destas enzimas no meio considerado.

Outros parâmetros do bioprocessamento que podem afetar a atividade e produtividade das xilanases durante a fermentação incluem: o pH, a temperatura, agitação e a aeração (KULKARNI *et al.*, 1999; HALTRICH *et al.*, 1996). A velocidade de agitação, a taxa de aeração, o pH e a temperatura têm demonstrado influenciar a produtividade da xilanase por fungos em vários estudos com fermentadores. Entretanto, as condições ótimas são únicas para cada microrganismo e processo.

2.6. Potenciais biotecnológicos das xilanases

O processo químico de remoção da lignina da polpa para produzir polpa final clara ou completamente branca é chamado branqueamento. O processo de branqueamento atualmente da polpa "kraft" utiliza grandes quantidades de compostos químicos baseados no cloro e bissulfito de sódio. Esses químicos branqueadores causam vários problemas nos efluentes das indústrias de papel e celulose. Os subprodutos da utilização desses químicos são substâncias organocloradas, algumas das quais são tóxicas, mutagênicas, persistentes e bioacumulantes e causam diversos distúrbios prejudiciais aos sistemas biológicos. Uma alternativa ao processamento convencional é o uso das enzimas, as quais têm fornecido um caminho simples e econômico para reduzir o uso de cloro e outros químicos branqueadores.

A xilanase pode reduzir o requerimento de químicos oxidantes em torno de 20 a 40% (BEG *et al.*, 2001).

As xilanases possuem um papel importante na retirada da casca, remoção da cor das fibras recicladas e na purificação da celulose para a preparação da polpa solubilizada. O pré-tratamento com xilanase tem diminuído o consumo de reagentes químicos no branqueamento e resultando em maior índice de brilho final. O clareamento enzimático resulta da quebra da ligação entre a lignina e a xilana e a abertura da estrutura da polpa (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000).

O pré-tratamento enzimático tem se mostrado satisfatoriamente compatível com os equipamentos industriais existentes. A adição de um passo enzimático para qualquer seqüência convencional de branqueamento resulta em um maior valor do índice de brancura final da polpa. O maior número de experiências industriais tem sido realizado na Europa, principalmente na Escandinávia, onde a maior parte da polpa "kraft" é produzida (KULKARNI *et al.*, 1999b).

As xilanases também encontram aplicações nas indústrias de panificação e forragem, devido à presença de substancial quantidade de hemicelulose na matéria-prima. Nos produtos de panificação, as xilanases agem no glúten da massa e auxiliam na redistribuição do conteúdo de água do pão, assim melhorando significativamente a textura, o volume da massa e o tempo de prateleira (SUBMANIYAN & PREMA, 2002). As xilanases são usadas frequentemente com as celulasas e as pectinases para clarificar vinhos e sucos, e para liquefazer frutas e vegetais, e no pré-tratamento da forragem para melhorar a digestibilidade do alimento dos ruminantes e para facilitar a compostagem (BEG *et al.*, 2001).

Outra aplicação encontra-se na indústria de processamento de alimentos, que já está utilizando as preparações enzimáticas comerciais produzidas pela Novo Nordisk. A preparação fúngica de β -glucanase de *Aspergillus niger*, comercializada com o nome Finizyme, é utilizada na fermentação da cerveja para evitar problemas de filtração e turvação causados pelas β -glucanas. As xilanases também possuem um papel importante para extração de café, óleos vegetais, amido, flavorizantes e pigmentos. Esses potenciais biotecnológicos das xilanases têm estimulado a pesquisa de enzimas adequadas e tecnologias para produção econômica em grande escala (KULIURNI *et al.*, 1999).

2.7. *Aplicações de xilanases*

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 polissacaridasas (por exemplo, celulases) 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, celulases, pectinases e outras hemicelulases 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 polissacaridasas, nas vinícolas e cervejarias, para reduzir a concentração de β -glicanas, que aumentam a 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 β -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 (arabinosidasas) 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.* (2002) mostrou a eficiência de várias enzimas na hidrólise e degradação da fibra de alfafa, utilizada para alimentação animal, tendo sido verificado que endo- β -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).

2.8. Fatores que influenciam na produção de xilanases

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

Quanto à atividade, enzimas são ativas numa faixa limitada de pH, isto porque a enzima possui vários grupos ionizáveis e mudanças no pH afetam o sítio catalítico e a conformação da enzima, essenciais para a manutenção da capacidade catalítica (SHULER & KARGI, 2002). Muitos outros fatores podem afetar a atividade enzimática como a força iônica do meio, pressão, o tampão empregado, a pureza dos reagentes e da enzima. Todos estes fatores devem ser experimentalmente determinados ou no mínimo, escolhidos arbitrariamente e mantidos constantes durante estudos (SHULER & KARGI, 2002).

2.8.1. 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.

2.8.2. 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 celulasas, 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.

2.9. Planejamento Experimental

Planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta de grande utilidade na pesquisa científica, pois, fornece com uma menor quantidade de experimentos uma maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência das variáveis e principalmente suas interações sobre a variável dependente em estudo (HOJO, 1997). Segundo MONTGOMERY (1991), um planejamento de experimentos consiste de testes que investigam um processo produtivo ou um determinado sistema, onde são alteradas as variáveis de entrada e observadas as respostas obtidas, com objetivo de determinar as variáveis que mais influenciam no resultado de um determinado processo. Esta metodologia, além de ser mais racional, possibilita economia de tempo, material e recursos quando comparada a experimentos feitos por tentativa (BOX *et al.*, 1978).

Com o desenvolvimento dos recursos computacionais que também se tornaram mais acessíveis, essa técnica passou a ser amplamente utilizada. Um planejamento deve

passar por várias etapas, sendo uma exploratória, uma de refinamento ou otimização e outra de análise estatística dos resultados final (HOJO, 1997).

A escolha do melhor método é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo. No entanto, há um número mínimo de ensaios que devem ser realizados conforme o número de fatores que se deseja estudar, para que a discussão dos resultados e a interpretação estatística não fiquem comprometidas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Em processos biotecnológicos, um grande número de fatores pode influenciar o rendimento, produtividade e conversão. Normalmente, não é evidente qual desses fatores são os mais importantes e deve-se, portanto, recorrer a técnicas de análise multivariada como a do planejamento experimental. Assim, é possível, além da determinação dos fatores importantes do processo, identificar as estruturas de controle para estratégias de operação diferenciadas.

2.9.1. Delineamento Plackett & Burman

Quando existe um grande número de variáveis pode-se aplicar um planejamento fatorial fracionado ou um planejamento proposto por PLACKETT & BURMAN (1946). Os planejamentos Plackett & Burman permitem estimar todos os efeitos principais ($k = n - 1$, onde n representa o número de ensaios) com variância mínima. O planejamento fatorial vem sendo aplicado com grande frequência na área de processos biotecnológicos para a otimização operacional, sobretudo na elaboração de meios de cultura, devido às inúmeras variáveis que estes processos envolvem.

Quando se necessita investigar um grande número de fatores a fim de estabelecer aqueles mais importantes (isto é, aqueles que estão relacionados à variável dependente de interesse), emprega-se um projeto que permita verificar os efeitos principais do maior número possível de fatores com um menor número de observações.

PLACKETT & BURMAN (1946) mostraram como os projetos fatoriais podem ser fracionados em diferentes maneiras para gerar projetos saturados onde o número de experimentos é um múltiplo de 4 ao invés de potências de 2. Os planejamentos mais usuais propostos neste método são para 12, 20, 24, 28 e 36 ensaios, sendo conveniente realizar

quatro ensaios a mais que o número de variáveis a serem estudadas (denominadas variáveis inertes).

2.9.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Quando o objetivo é verificar a curvatura de um plano, ou seja, quando se deseja verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão, deve-se utilizar o planejamento composto central (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Na maioria dos estudos em que o planejamento experimental é aplicado, o planejamento do tipo DCCR é aplicado ao final da estratégia para elaborar o modelo preditivo (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

2.9.2.1. Adição de pontos centrais

Para tornar possível a execução, ao menos aproximada, de inferência estatística, é usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental. Com tal procedimento estaremos viabilizando o cálculo dos resíduos e, conseqüentemente, de erro padrão e então das estimativas por intervalo, dos testes e assim por diante.

A realização de no mínimo três ensaios na condição de ponto central permite a estimação do erro puro, sendo possível avaliar a repetibilidade do processo que, do ponto de vista prático, auxilia verificar se o processo em estudo está sob controle. Além disso, realizar alguns ensaios no ponto central possibilita verificar a existência ou não de curvatura nesta região.

2.9.2.2. Adição de pontos axiais

Muitas vezes temos interesse em ajustar às respostas experimentais um modelo de segunda ordem. No caso de um fatorial com duas variáveis (2^2) tal modelo tem a seguinte forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

x_1 e x_2 são as variáveis codificadas;

β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os parâmetros do modelo de regressão.

No entanto, no modelo a ser ajustado nesse exemplo, tem-se 4 pontos fatoriais mais um ponto gerado pela média dos pontos centrais, caracterizando 5 observações independentes, naturalmente insuficiente para estimar 6 parâmetros.

Em tais situações, uma alternativa interessante consiste em adicionar ao fatorial 2^k pontos axiais gerando um delineamento extremamente útil, denominado Delineamento Composto Central. Há várias possibilidades para a escolha dos níveis nos pontos axiais, uma delas é a utilização de pontos do tipo $\pm\alpha$, onde $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Alguns valores de α estão descritos na Tabela 1.

Um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais assim definidos é dito Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). De modo geral, num DCCR com 2 níveis originais, temos 2^k pontos fatoriais mais duas vezes o número de efeitos principais (pontos axiais) somados a um número arbitrário de pontos centrais.

Tabela 1. Valores de α em função de k.

K	2	3	4	5	6
α	$\pm 1,4142$	$\pm 1,6818$	$\pm 2,0000$	$\pm 2,3784$	$\pm 2,8284$

3. OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado visando-se otimizar a produção de xilanase por levedura silvestre isolada da Mata Atlântica. Para isso, foram utilizadas as seguintes ferramentas:

1. Análise da influência do tampão fosfato sobre o crescimento do microrganismo e a produção da enzima;
2. Planejamento experimental constituído de duas etapas: delineamento Plackett & Burman e delineamento composto central rotacional (DCCR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) situado na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) / UNICAMP.

4.1. Seleção da cepa produtora de xilanase

4.1.1. Microrganismos utilizados

Sendo o objetivo deste estudo otimizar a capacidade de degradação da xilana solúvel como única fonte de carbono, foram selecionadas duas das cepas de leveduras silvestres que apresentaram maior produção e estabilidade enzimática utilizadas no trabalho de MOTTA (2008). Estas cepas fazem parte do banco de culturas do LEB e foram denominadas AY₁₀ e AAD₅ de acordo com o trabalho de HERNALSTEENS (2006).

4.1.2. Fermentação em meio líquido enriquecido

De acordo com MOTTA (2008), para as cepas AY₁₀ e AAD₅, os maiores níveis de atividade enzimática foram encontrados quando cultivadas em meio sintético enriquecido. Por isso, optou-se pela utilização deste meio nesta etapa do trabalho, cuja composição está expressa na Tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 6,0 com HCl e então dividiu-se o meio preparado em erlenmeyers de 500 ml contendo 150 ml, realizando-se em seguida a autoclavagem do material a 121°C por 15 min.

Tabela 2. Composição do meio sintético enriquecido.

Componentes	Composição (g.L ⁻¹)
Xilana de <i>birchwood</i>	10
Extrato de levedura	3
KH ₂ PO ₄	7
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
Peptona	5

A reativação das cepas AY₁₀ e AAD₅, estocadas em ultra-freezer a -80°C, foi feita em meio GYMP (Tabela 3), pH 6,0, permanecendo, após o esgotamento neste meio, em estufa a 30°C por 48 horas. Realizada a reativação, iniciou-se o preparo do inóculo, transferindo a massa celular da superfície do ágar inclinado para erlenmeyer contendo 150 ml do meio sintético enriquecido que permaneceu durante 24 horas a temperatura de 30°C sob agitação de 150 rpm em shaker.

Tabela 3. Composição do meio GYMP.

Componentes	Composição (g.L ⁻¹)
Glicose	20
Extrato de levedura	5
Extrato de malte	10
Ágar	20
Fosfato de sódio monobásico	2

A fermentação foi iniciada vertendo-se 15 ml deste inóculo em 135 ml do mesmo meio sintético enriquecido e incubados, também sob agitação de 150 rpm e a 30°C, por 72 horas. Amostras foram retiradas a cada 12 horas a partir do ponto 0, marcado pelo momento que o meio foi inoculado. Para cada ponto da fermentação, foram feitas análises de atividade enzimática, pH e densidade ótica, sendo que para estes dois últimos a leitura foi realizada imediatamente após a coleta das amostras.

A estimativa da atividade enzimática foi feita posteriormente e, por isso, a amostra foi, imediatamente após sua coleta, centrifugada a 6000 rpm a 5°C durante 15 minutos e o sobrenadante, onde se encontrava a enzima produzida extracelularmente, foi estocado sob congelamento em freezer (-18 °C).

4.2. Metodologia analítica

4.2.1. Determinação da atividade da xilanase

O sobrenadante, armazenado de acordo com o item 4.1.2, foi descongelado à temperatura ambiente e a atividade da enzima xilanase foi testada segundo a metodologia descrita por BAILEY *et al* (1992). De acordo com essa metodologia, extrato enzimático é encubado com solução aquosa de xilana de birchwood 1% (p/v) dissolvida em 50 mM de tampão citrato (pH 5,3) em banho termostaticado agitado. Neste trabalho, 0,6 mL do extrato enzimático sem diluição foi encubado com 5,4 mL de solução aquosa de xilana em banho agitado (modelo TECNAL TE-184) a 50°C por 6 minutos. Amostras de 0,5mL foram retiradas no tempo 0 minuto, 3 e 6 minutos após a adição do extrato enzimático.

Os açúcares redutores (como a D-xilose) liberados ao encubar o extrato enzimático com a solução de xilana foram testados de acordo com o método descrito por QINNGHE *et al* (2004) e MILLER (1959). Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada em 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio e, em seguida, estes foram submetidos a banho fervente por 5 minutos, resfriamento em banho de gelo e adição de 8 mL de solução 0,05M de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Após este procedimento, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro modelo DU 640, fabricado por Beckman Coulter, em comprimento de onda de 540 nm. As leituras das absorvâncias foram posteriormente convertidas em atividade enzimática a partir de uma curva padrão, descrita a seguir.

Uma unidade de atividade (UI) da xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de D-xilose por minuto de reação a 50°C.

Os brancos enzimáticos considerados nesta estimativa da atividade foram água destilada, uma vez que o interesse nesse caso era a inclinação da curva da absorvância *versus* o tempo de reação.

4.2.2. Curva padrão da quantidade de açúcar redutor

A curva padrão foi desenvolvida de acordo com a estimativa da atividade enzimática (item 4.2.1) como descrito por BAILEY (1992). No entanto, o extrato

enzimático adicionado à solução de 1% xilana de birchwood (p/v) foi substituído por soluções com diferentes concentrações de D-xilose.

4.2.3. Determinação de Massa seca

A determinação de massa seca das amostras foi realizada espectrofotometricamente através da leitura da absorbância a 600 nm, utilizando água destilada para calibração do aparelho. Para avaliação da massa celular, construiu-se uma curva-padrão de densidade ótica *versus* massa seca, sendo obtida após secagem da amostra em estufa (60°C). Paralelamente, foram feitas diluições sucessivas do meio fermentado e mediu-se a densidade ótica. A partir da densidade ótica determinou-se indiretamente a massa seca para cada diluição.

4.2.4. Determinação de pH

O pH foi medido diretamente em potenciômetro.

4.3. Estudo da influência do tampão fosfato

Sendo o objetivo desta etapa do trabalho analisar a influência do tampão fosfato sobre a produção de xilanase pela cepa AY₁₀, foram realizadas duas fermentações paralelas sob as mesmas condições descritas no item 4.1.2 e obedecendo aos mesmos procedimentos expostos nesse mesmo item. Em uma das fermentações o meio de cultura foi alterado retirando-se o tampão fosfato e para a outra não houve alteração do meio (Tabela 4).

Tabela 4. Composição dos meios de cultura utilizados para análise da influência do tampão fosfato sobre a produção da xilanase.

Meios comparados	Componentes	Composição (g.L ⁻¹)
Meio com adição de tampão fosfato	Xilana de <i>birchwood</i>	10
	Extrato de levedura	3
	KH ₂ PO ₄	7
	K ₂ HPO ₄	2
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1
	Peptona	5
Meio sem adição de tampão fosfato	Xilana de <i>birchwood</i>	10
	Extrato de levedura	3
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1
	Peptona	5

4.4. Planejamento Experimental

4.4.1. Delineamento Plackett & Burman

Visando-se otimizar a produção de xilanase pela cepa AY₁₀ através da escolha do melhor meio de cultura e das condições de fermentação mais adequadas, realizou-se um delineamento Plackett & Burman (PB). Este delineamento era o mais indicado a esta etapa, uma vez que sete variáveis seriam analisadas a fim de identificar aquelas que exercem influência sobre a produção da enzima xilanase.

As variáveis independentes estudadas foram concentração de xilana, extrato de levedura, sulfato de magnésio, sulfato de amônio e peptona, além do pH do meio de cultura e a temperatura de fermentação. Os valores dos níveis do delineamento podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Variáveis consideradas no delineamento Plackett & Burman e níveis utilizados.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Xilana (g.L ⁻¹)	5	10	15
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	1	2	3
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0,1	0,3	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	0	2,2	4,4
Peptona (g.L ⁻¹)	1	2	3
pH	5	6	7
Temperatura (°C)	25	30	35

O processo de preparo do inóculo e de reativação da levedura foi idêntico ao descrito no item 4.1.2; no entanto, o meio de cultura utilizado nesta etapa foi o meio sintético enriquecido sem adição de tampão fosfato, devido aos resultados da influência deste tampão sobre a atividade enzimática. Além disso, o mesmo inóculo foi empregado para todos os ensaios buscando-se minimizar as diferenças que pudessem comprometer o planejamento.

Foram adicionados quatro pontos centrais ao delineamento Plackett & Burman de 12 ensaios, totalizando dezesseis ensaios, o que assegurou a confiabilidade deste planejamento, cuja matriz com os valores codificados e reais encontra-se na Tabela 6. Os cálculos dos efeitos e erros padrões foram realizados utilizando o software “Statistica”.

A resposta analisada (variável dependente) foi a atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). O tempo total da fermentação foi de 60 horas e amostras foram coletadas a cada 12 horas a partir do ponto 0h. Para todos os pontos onde houve coleta de amostras (0, 12, 24, 36, 48 e 60h) foram feitas análises de pH, biomassa e atividade. A análise estatística da atividade em função dos ensaios foi realizada para todos os pontos da fermentação e, de posse dos resultados, determinou-se o ponto que se aplicava melhor à análise das respostas do delineamento.

Tabela 6. Matriz dos valores codificados e reais do delineamento Plackett & Burman realizado.

Ensaio	Variáveis						
	Xilana	Extrato de levedura	MgSO ₄ .7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	Peptona	pH	Temperatura
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0

4.4.2. Delineamento Composto Central Rotacional

O delineamento Plackett & Burman, como exposto anteriormente, foi utilizado para determinar, dentre as variáveis estudadas, as que exerciam influência sobre a produção da enzima. Dessa forma, após a identificação dessas variáveis, realizou-se um planejamento completo, o delineamento composto central rotacional (DCCR), buscando elaborar um modelo matemático e, através da análise da superfície de resposta gerada por este modelo, obter as condições em que a produção de xilanase fosse máxima.

Portanto, nessa etapa do trabalho, foi empregado um DCCR 2² com três repetições na condição central e quatro ensaios nos pontos axiais, totalizando onze ensaios, e a matriz com os valores codificados está expressa na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz codificada do DCCR 2² realizado.

Ensaio	Variáveis	
	Xilana	Temperatura
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

As variáveis independentes analisadas foram temperatura (°C) e concentração de xilana no meio de cultura (g.L⁻¹) e os valores dos níveis dessas variáveis estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Variáveis consideradas no DCCR e níveis utilizados.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Xilana (g.L ⁻¹)	10	13	20	27	30
Temperatura (°C)	25	26,5	30	33,5	35

Assim como no delineamento PB, o meio de crescimento e o preparo do inóculo foram os mesmos descritos no item 4.1.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Seleção da cepa produtora de xilanase*

MOTTA (2008) selecionou entre 349 cepas de leveduras silvestres, presentes no banco de cultura do LEB, aquelas que produziram xilanases com maior atividade. Dentre elas encontram-se, com valores de atividade superiores às demais, as cepas AY₁₀ e AAD₅, as quais foram caracterizadas em termos de temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH e efeito da concentração do substrato sobre a atividade das enzimas produzidas por essas cepas.

Além disso, os resultados apresentados por MOTTA (2008) indicaram que os níveis de atividade obtidos poderiam ser ainda maiores uma vez que o meio de cultura e as condições de fermentação não foram otimizadas nesse trabalho. Dessa forma, as cepas AY₁₀ e AAD₅ foram utilizadas no presente estudo, onde o objetivo principal foi maximizar a atividade das xilanases produzidas por estas cepas.

Fermentações sob as mesmas condições foram realizadas utilizando-se meio sintético enriquecido e as duas cepas de leveduras a fim de confirmar seu potencial de produção de xilanase e determinar qual delas seria a mais indicada para o desenvolvimento deste estudo.

Os valores obtidos para o pH, biomassa e atividade da fermentação com a cepa AY₁₀ e AAD₅ encontram-se nas Tabela 9 e na Tabela 10, respectivamente. A comparação entre esses valores pode ser mais bem visualizada pelo comportamento desses parâmetros em função do tempo de fermentação nos dois próximos gráficos apresentados.

Tabela 9. Valores de pH, biomassa e atividade encontrados para a cepa AY₁₀.

Cepa AY ₁₀			
Tempo (h)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Atividade (μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
0	5,99	0,14	0,10
12	6,11	0,59	0,28
24	6,43	1,74	1,81
36	6,60	3,25	3,53
48	6,63	3,27	3,02
60	6,65	3,30	2,31
72	6,67	3,32	2,13

Tabela 10. Valores de pH, biomassa e atividade enzimáticas para a cepa AAD₅.

Cepa AAD ₅			
Tempo (h)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Atividade (μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
0	5,95	0,12	0,27
12	6,15	0,70	0,25
24	6,57	1,52	0,33
36	6,58	3,13	3,24
48	6,62	3,17	2,89
60	6,67	3,21	3,12
72	6,66	3,21	2,72

Os valores de pH obtidos ao longo da fermentação para ambas as cepas foram próximos, havendo uma diferença entre eles apenas após aproximadamente 24 horas de fermentação, onde o valor de pH para a cepa AY₁₀ foi de 6,43 e para a cepa AAD₅ foi de 6,57. O valor inicial do pH das fermentações foi próximo ao ajustado antes da autoclavagem do meio (6,0) como esperado. Ao final das 72 horas de fermentação o pH obtido foi de 6,67 para a cepa AY₁₀ e 6,66 para a cepa AAD₅.

A biomassa inicial das fermentações foi aproximadamente a mesma - $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ para a AAD₅ e $0,14 \text{ g.L}^{-1}$ para a AY₁₀ - pois o processo de preparo do inóculo foi idêntico para as duas fermentações. Como pode ser observado pela Figura 4 e pela Figura 5, em 36 horas de fermentação, tanto para a cepa AY₁₀ quanto para a AAD₅, a biomassa atingiu um valor próximo do máximo encontrado para cada fermentação, cerca de 3 g.L^{-1} , permanecendo estável até o fim da fermentação.

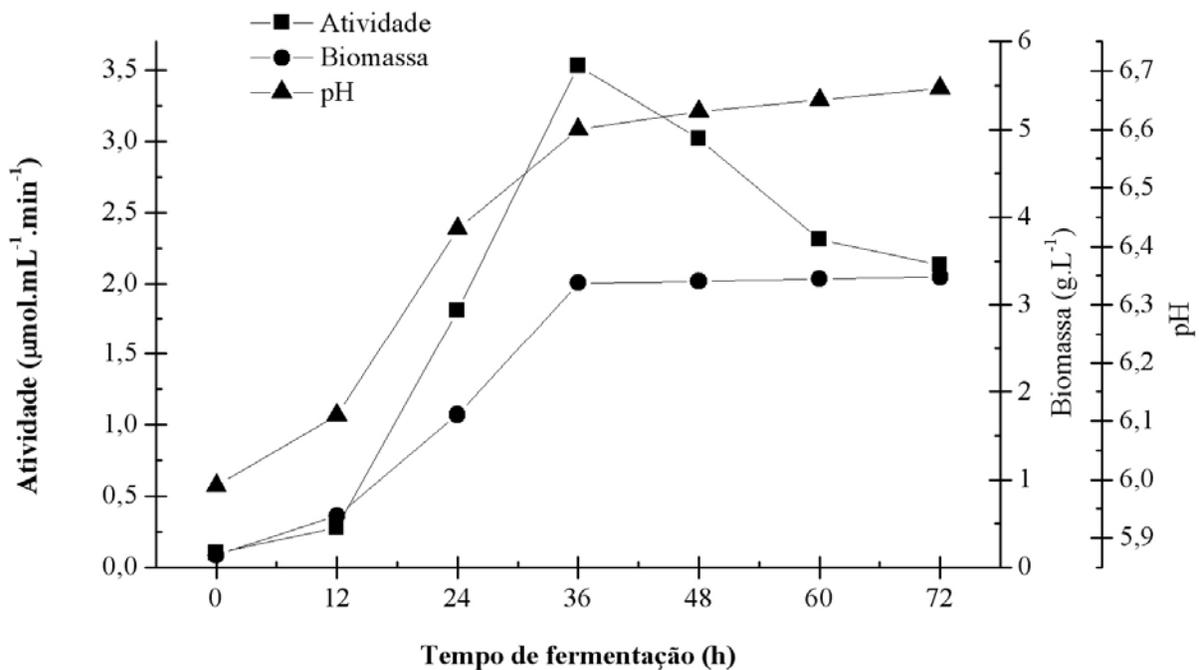


Figura 4. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática obtidos para a cepa AY10 *versus* o tempo de fermentação.

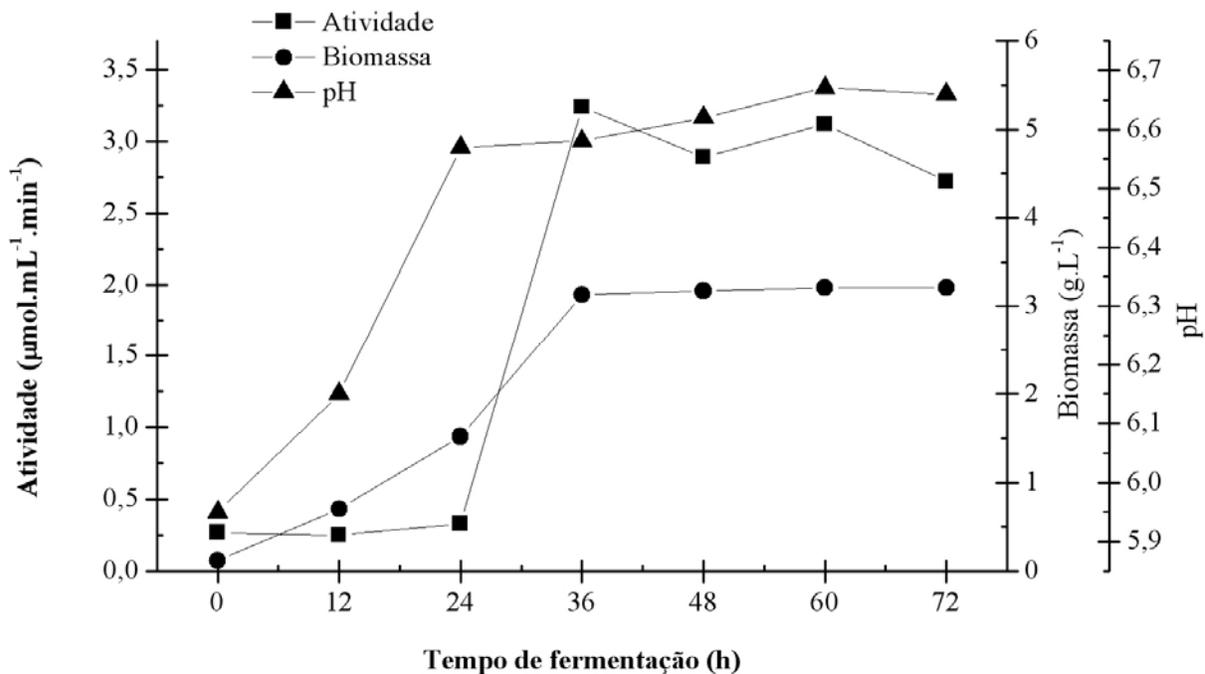


Figura 5. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática obtidos para a cepa AAD5 *versus* o tempo de fermentação.

Embora as curvas de atividade em relação ao tempo de fermentação tenham apresentado um comportamento semelhante, podemos observar que a atividade encontrada para a cepa AY₁₀ foi superior à obtida para a AAD₅ a 24 e 36 horas de fermentação, sendo o valor de atividade da AY₁₀ 5 vezes maior que o da AAD₅ a 24 horas.

A partir de 48 horas pode ser observada uma queda na atividade para as duas cepas, sendo esta queda mais brusca no caso da cepa AY₁₀. Segundo MOTTA (2008), a atividade enzimática máxima para a cepa AAD₅ é obtida a 60 horas de fermentação sob as mesmas condições aqui adotadas, o que pode explicar o fato da diminuição mais lenta da atividade para essa cepa neste estudo.

Além de apresentar uma maior atividade, foi constatado no trabalho de MOTTA (2008) que a enzima produzida pela cepa AY₁₀ é mais estável que a AAD₅. Em termos de pH esta enzima é estável na faixa de 3,5 a 6,0 e, quanto à temperatura, somente 25% de sua atividade é perdida após 5 minutos de incubação a 80°C.

Por isso, selecionou-se para ser utilizada nos estudos de otimização da produção de xilanase a cepa AY₁₀ e os resultados obtidos encontram-se nos próximos itens.

5.2. Estudo da influência do tampão fosfato

A influência do tampão fosfato sobre a atividade foi constatada no trabalho de MOTTA (2008), onde, ao realizar um planejamento experimental visando encontrar o pH e temperatura ótimos para a xilanase, verificou-se que a presença de tampão fosfato provocou uma diminuição na atividade enzimática.

Por isso, neste trabalho, foi feita a investigação dessa influência, uma vez que o objetivo principal era encontrar as condições ótimas de produção desta enzima a partir da cepa AY₁₀. Foram realizadas duas fermentações em paralelo em meios de cultura distintos onde a única fonte de variação foi adição do tampão fosfato. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11 (meio contendo tampão fosfato) e Tabela 12 (meio sem tampão fosfato).

Através da análise desses resultados, pode-se notar que tanto a biomassa quanto a atividade foram bem maiores quando não havia tampão fosfato no meio.

Tabela 11. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática para a cepa AY₁₀ em fermentação utilizando meio de cultura enriquecido contendo tampão fosfato.

Com adição de tampão fosfato			
Tempo (h)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Atividade (μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
0	5,98	0,35	0,75
12	6,22	1,03	1,77
24	6,53	1,80	2,76
36	6,66	1,85	3,26
48	6,72	1,91	4,23
60	6,79	2,01	5,91
72	6,81	1,99	2,62

Tabela 12. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática para a cepa AY₁₀ em fermentação utilizando de cultura enriquecido sem tampão fosfato.

Sem adição de tampão fosfato			
Tempo (h)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Atividade (μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹)
0	6,01	1,18	0,41
12	7,01	5,92	1,29
24	8,04	6,05	3,69
36	8,12	6,69	31,67
48	8,11	11,32	26,85
60	8,00	17,33	25,94
72	7,96	17,75	23,65

De acordo com a Figura 6 e com a Figura 7, o valor de pH atingiu valores superiores a 8,0 quando se utilizou meio não tamponado, enquanto para o meio com adição do tampão o valor máximo atingido foi de 6,81, indicando o controle eficaz do pH neste caso.

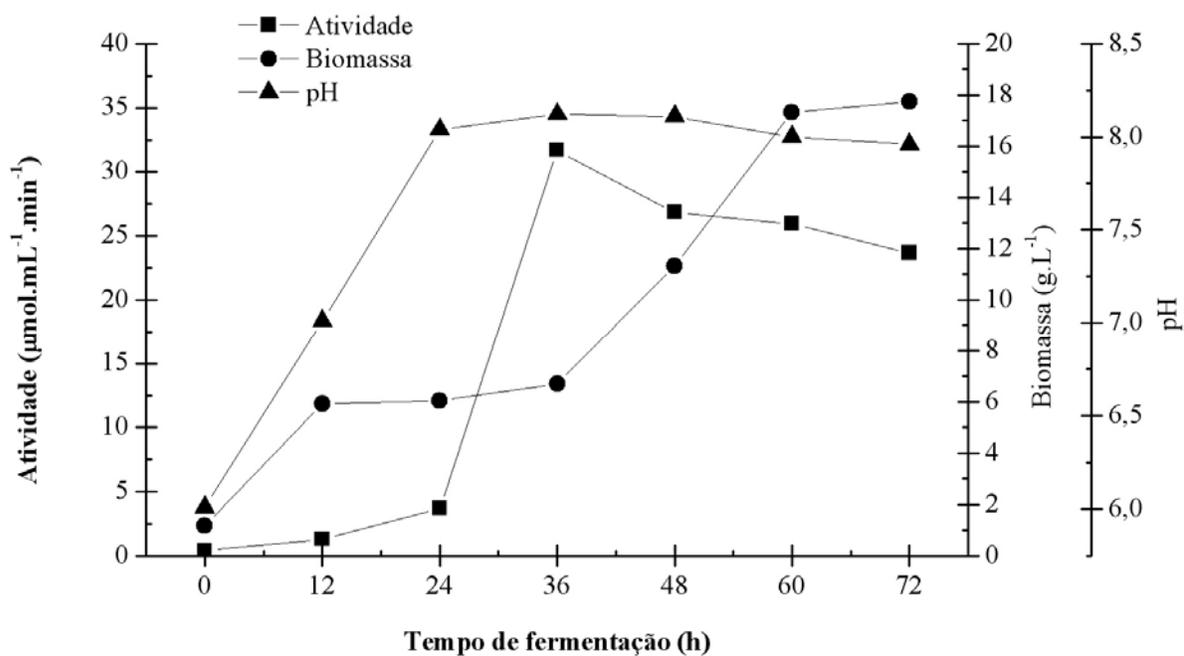


Figura 6. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática *versus* tempo de fermentação utilizando meio sem tampão fosfato.

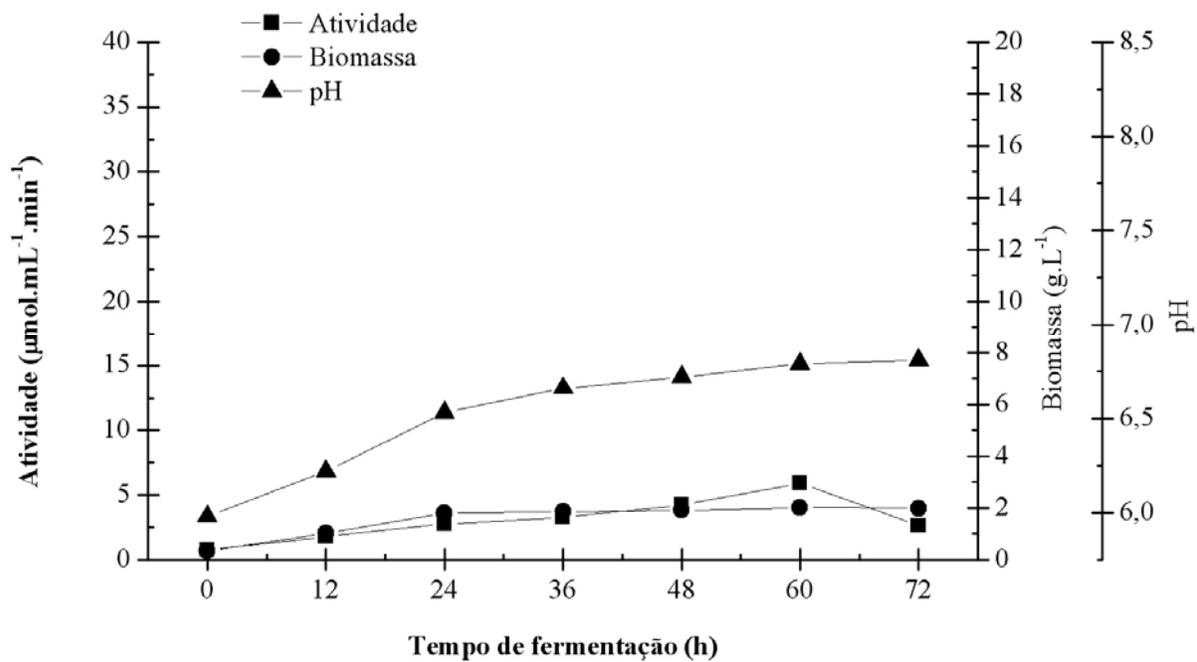


Figura 7. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática *versus* tempo de fermentação utilizando meio com tampão fosfato.

Em termos de biomassa, os valores encontrados indicam que a presença de tampão fosfato afeta negativamente o crescimento da cepa de levedura AY₁₀, uma vez que a biomassa obtida com o meio de fermentação sem este tampão foi superior à obtida para o meio com tampão ao longo das 72 horas de fermentação. Em 60 horas de fermentação, a biomassa obtida sem a utilização do tampão chegou a quase 9 vezes àquela obtida para o meio tamponado.

A atividade enzimática apresentou comportamento semelhante à biomassa quanto à presença do tampão. Em meio não tamponado a atividade foi muito maior, sobretudo após 36 horas de fermentação, onde na ausência do tampão a atividade obtida foi de 31,67 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e, nesse mesmo ponto da fermentação, em meio com adição do tampão obteve-se 3,26 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, quase dez vezes menor. Além disso, o maior valor de atividade da xilanase em meio tamponado ocorreu somente após 60 horas de fermentação, enquanto, para o meio sem adição de tampão fosfato, a maior atividade foi obtida num tempo bem menor (36 horas), indicando uma maior produtividade.

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que a adição de tampão fosfato afeta negativamente o crescimento da cepa de levedura deste estudo, além de prejudicar a atividade da xilanase produzida. De acordo com MOTTA (2008), a queda na atividade quando se utiliza tampão fosfato pode estar ligada à alteração da estabilidade da enzima.

Os resultados obtidos a partir dessa comparação indicaram que a utilização do tampão exerce um efeito negativo sobre a atividade da xilanase. Portanto, sendo nosso objetivo encontrar condições que maximizem a produção e atividade desta enzima, optou-se por, nas etapas seguintes desse trabalho, não utilizar esta tampão na composição dos meios.

5.3. Planejamento Experimental

Assim como na maioria dos processos biotecnológicos, inúmeras variáveis estão envolvidas no processo de otimização da produção da xilanase. Neste trabalho, parâmetros relacionados à composição do meio e às condições de fermentação foram testados por meio de planejamentos experimentais em duas etapas. Num primeiro estudo, optou-se por realizar um delineamento Plackett & Burman para definir, dentre as sete variáveis

analisadas, quais exerciam influência sobre a produção e atividade da enzima e, a partir dos resultados obtidos, empregar um planejamento fatorial completo.

5.3.1. Delineamento Plackett & Burman

Quando se necessita investigar um grande número de fatores a fim de estabelecer aqueles que estão relacionados à variável dependente de interesse, emprega-se um projeto que permita verificar os efeitos principais do maior número possível de fatores com o menor número possível de observações (PLACKETT & BURMAN, 1946).

Neste trabalho, sete variáveis foram analisadas pelo planejamento por se tratarem de parâmetros importantes em relação ao crescimento do microrganismo e à produção da enzima em questão. Optou-se, portanto, por realizar um PB a fim de analisar mais variáveis com um menor número de experimentos, utilizando 12 ensaios (respeitando o mínimo de 4 ensaios a mais que o número de variáveis independentes) somados aos 4 ensaios nos pontos centrais.

Os resultados obtidos pela análise de pH, biomassa e atividade encontram-se expressos nas tabelas a seguir. Embora a variável dependente adotada tenha sido a atividade (objeto de interesse desse estudo), foram feitas análises de pH e biomassa para todos os ensaios nos seis pontos de amostragem das fermentações (0, 12, 24, 36, 48, 60h).

É importante ressaltar que não houve adição de tampão fosfato no meio de cultura aqui utilizado, visto que este componente possui efeito negativo sobre a atividade. Isso explica o fato do pH inicial de todos os ensaios do PB apresentarem valores mais próximos de 7.0, embora o pH dos meios, tanto do inóculo quanto dos ensaios, tenha sido ajustado para 6.0.

Tabela 13. Valores de pH encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Ensaio	pH					
	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	6,73	6,83	7,26	7,64	7,81	7,56
2	6,38	7,44	7,55	7,87	8,09	8,21
3	6,60	7,92	8,44	8,73	8,86	8,98
4	6,94	7,04	7,06	7,35	7,46	7,30
5	6,27	7,63	7,87	7,97	8,14	8,32
6	6,97	7,71	7,97	7,81	8,23	8,45
7	6,93	7,64	7,85	8,10	8,27	8,42
8	6,65	7,68	7,94	8,20	8,27	8,39
9	6,93	7,83	8,32	8,51	8,56	8,60
10	7,00	7,55	7,81	7,96	8,32	8,15
11	7,08	7,76	8,04	8,34	8,42	8,61
12	6,91	7,45	7,73	8,04	8,11	8,11
13	6,84	7,16	7,67	8,03	8,13	8,62
14	6,82	7,36	7,92	8,15	8,43	8,49
15	6,82	7,50	7,92	8,10	8,23	8,38
16	6,83	7,37	8,06	8,24	8,34	8,49

De acordo com a Figura 8, os maiores valores de pH foram obtidos para o ensaio 3 e os menores valores para o ensaio 4. Através deste mesmo gráfico, pode ser observado o comportamento semelhante nos 16 ensaios, atingindo valores bem mais elevados que aqueles observados nas etapas anteriores. Estes valores elevados foram consequência da exclusão do tampão fosfato e da alteração da composição do meio.

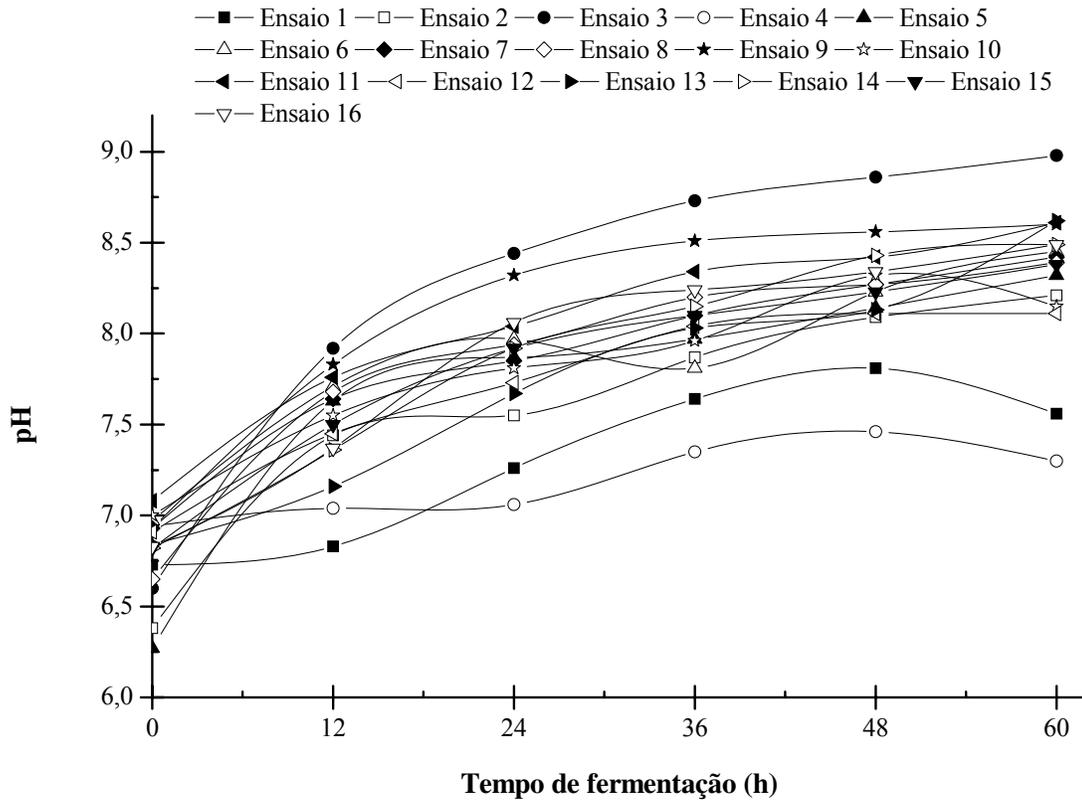


Figura 8. Gráfico da evolução do pH em função do tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.

Os valores de biomassa encontrados para os ensaios ao longo da fermentação encontram-se na Tabela 14 e, através de Figura 9, é possível visualizar o crescimento da cepa AY₁₀ em relação ao tempo de fermentação para os 16 ensaios.

O maior valor de biomassa, 33,78g.L⁻¹, ocorreu com 36 horas de fermentação para o ensaio 6, cuja composição do meio possui o nível máximo de concentração para todos os componentes, com exceção do sulfato de amônio. O ensaio 9, onde os níveis de concentração de xilana e temperatura foram mínimos, apresentou a média mais baixa de biomassa considerando as 60 horas de fermentação.

Tabela 14. Valores de biomassa encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Ensaio	Biomassa (g.L ⁻¹)					
	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	3,88	17,52	30,43	28,42	28,89	5,56
2	4,03	16,84	27,05	26,93	26,13	25,05
3	3,92	10,72	12,47	11,27	9,72	9,93
4	6,50	15,47	26,50	26,55	24,47	8,26
5	5,86	14,02	19,91	23,24	22,22	18,09
6	6,57	22,25	32,31	33,78	31,22	16,29
7	2,73	6,44	8,41	8,00	6,97	17,76
8	2,92	4,89	5,86	5,84	5,24	15,47
9	3,04	5,78	6,41	6,30	5,56	4,71
10	7,13	15,46	20,13	26,21	25,05	24,74
11	4,36	9,20	10,08	10,12	9,93	9,08
12	3,71	7,02	8,19	9,06	8,26	8,29
13	5,63	15,09	18,18	19,25	18,09	14,51
14	5,51	16,24	18,89	18,05	16,29	14,75
15	6,08	15,46	18,16	18,92	17,76	16,00
16	4,06	14,88	16,99	16,78	15,47	12,96

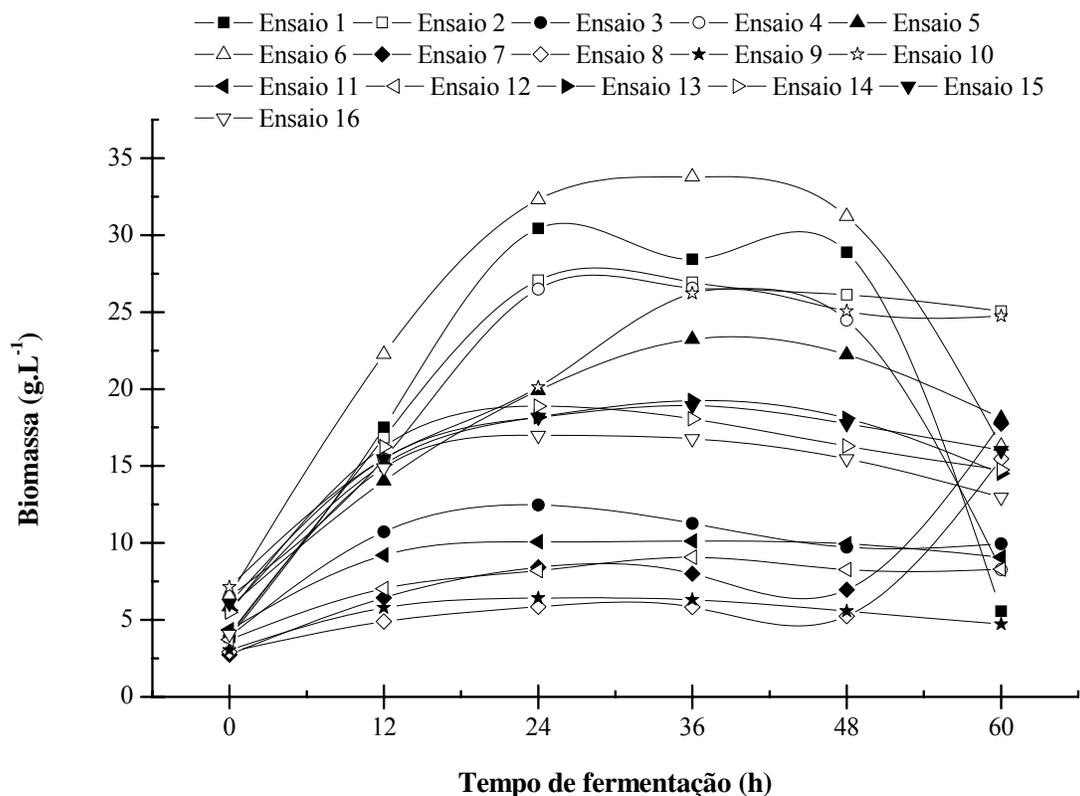


Figura 9. Evolução da biomassa em função do tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.

Em termos de atividade, o maior valor ($20,64 \mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$) foi obtido no ensaio 10 a 36 horas, cujos fatores relevantes, se compararmos este ensaio aos demais, são os níveis máximos de temperatura e concentração de xilana e o nível mínimo de concentração de sulfato de amônio. Além disso, é interessante observar que os menores valores de atividade foram encontrados para o ensaio 12, que possui níveis mínimos de concentração para todos os componentes de meio de cultura e a temperatura mais baixa dentre aquelas empregadas neste planejamento.

Tabela 15. Valores de atividade encontrados para os 16 ensaios realizados no delineamento Plackett & Burman para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Ensaio	Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)					
	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	2,56	5,01	12,11	10,48	9,73	10,75
2	0,41	2,56	3,09	2,72	3,04	2,78
3	1,03	1,90	4,36	4,51	3,36	5,09
4	0,56	2,76	1,54	9,16	1,66	10,09
5	0,36	4,13	7,48	7,70	6,94	4,35
6	0,15	1,23	3,59	4,03	1,88	7,40
7	0,37	5,33	3,86	7,66	5,52	8,39
8	0,95	4,22	6,71	8,26	4,20	0,22
9	0,03	0,38	1,16	4,46	3,29	17,56
10	4,59	13,01	19,27	20,64	20,24	15,23
11	2,69	13,94	8,69	13,13	15,43	4,09
12	0,03	0,90	1,06	1,78	4,28	9,93
13	0,85	6,52	7,51	6,97	10,03	12,17
14	0,75	6,23	8,79	10,82	13,75	12,17
15	0,84	5,99	8,37	10,65	10,26	9,02
16	0,90	6,50	8,51	10,26	11,24	10,38

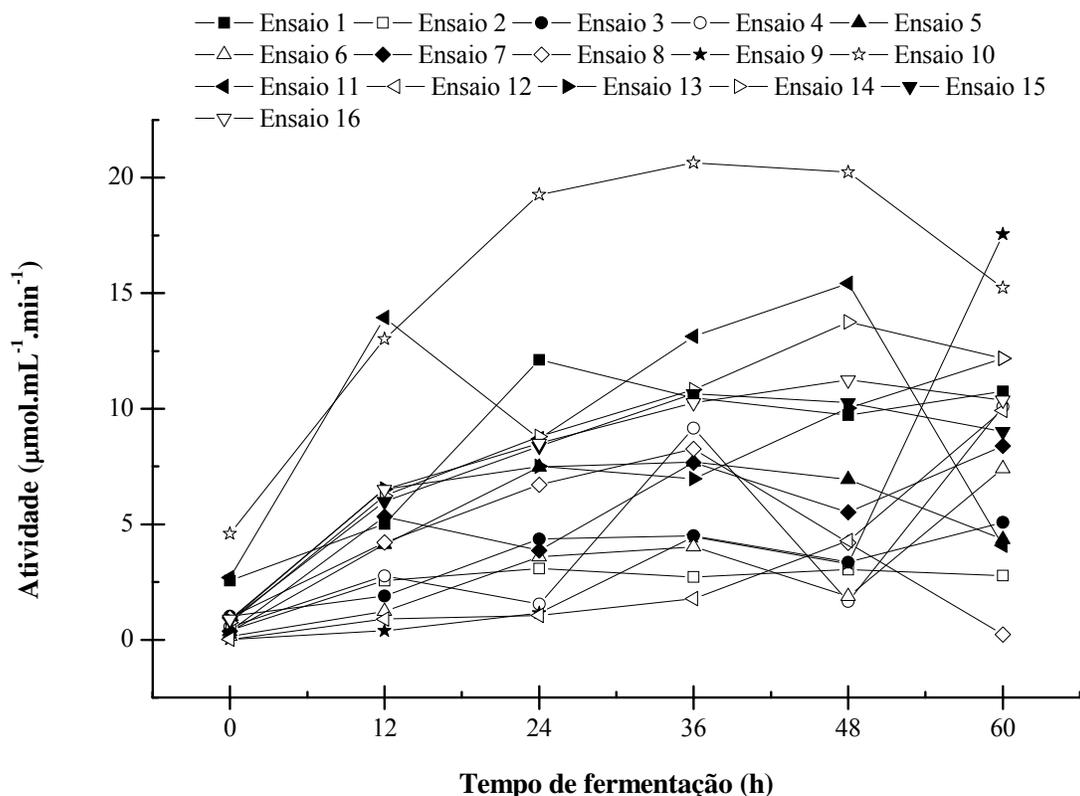


Figura 10. Gráfico da atividade versus o tempo de fermentação para os 16 ensaios do delineamento PB realizado.

A Tabela 16 apresenta os valores codificados deste planejamento, bem como a atividade enzimática para cada ensaio a 24 h de fermentação e a Tabela 17 apresenta os valores reais e as respostas. Observando os resultados nestas tabelas, verifica-se que a atividade varia de 1,06 a 19,27 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, conforme a condição do ensaio, e que a atividade média considerando os pontos centrais foi de 8,3.

Foram feitas análises utilizando o “Software Statística 7.0” para cada tempo de fermentação e os resultados obtidos com os valores de atividades em 24 horas de fermentação apresentaram-se mais coerentes, em termos de coeficiente de correlação e das variáveis que foram significativas. Além disso, as variáveis indicadas pela análise estatística como significativas em 24 horas de processo, também foram consideradas estatisticamente significativas quando analisados os outros pontos da fermentação.

Pode-se observar que, em geral, os ensaios com maior concentração de xilana e temperatura mais alta foram os que obtiveram os maiores valores de atividade enzimática. O valor mais elevado de atividade da xilanase foi encontrado no ensaio 10, que também apresentou alto valor de biomassa, principalmente em 36 horas de fermentação. No entanto, análises estatísticas foram realizadas a fim de investigar a relação dessas variáveis independentes com a biomassa e nenhum resultado satisfatório foi obtido.

Tabela 16. Matriz com os valores codificados do delineamento Plackett & Burman e as respostas obtidas.

Ensaio	Xilana (g.L ⁻¹)	Extrato de. levedura (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ . 7H ₂ O (g.L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Atividade (UI) 24 horas
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	12,11
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,09
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4,36
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	1,54
5	1	1	-1	1	1	-1	1	7,48
6	1	1	1	-1	1	1	-1	3,59
7	-1	1	1	1	-1	1	1	3,86
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	6,71
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1,16
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	19,27
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	8,69
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,06
13	0	0	0	0	0	0	0	7,51
14	0	0	0	0	0	0	0	8,79
15	0	0	0	0	0	0	0	8,37
16	0	0	0	0	0	0	0	8,51

Tabela 17. Matriz com os valores reais do delineamento Plackett & Burman e as respostas obtidas.

Ensaio	Xilana (g.L ⁻¹)	Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	MgSO ₄ . 7H ₂ O (g.L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	Peptona (g.L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Atividade (UI) 24 horas
1	15	1	0,5	0	1	5	35	12,11
2	15	3	0,1	4,4	1	5	25	3,09
3	5	3	0,5	0	3	5	25	4,36
4	15	1	0,5	4,4	1	7	25	1,54
5	15	3	0,1	4,4	3	5	35	7,48
6	15	3	0,5	0	3	7	25	3,59
7	5	3	0,5	4,4	1	7	35	3,86
8	5	1	0,5	4,4	3	5	35	6,71
9	5	1	0,1	4,4	3	7	25	1,16
10	15	1	0,1	0	3	7	35	19,27
11	5	3	0,1	0	1	7	35	8,69
12	5	1	0,1	0	1	5	25	1,06
13	10	2	0,3	2,2	2	6	30	7,51
14	10	2	0,3	2,2	2	6	30	8,79
15	10	2	0,3	2,2	2	6	30	8,37
16	10	2	0,3	2,2	2	6	30	8,51

Como foi utilizado um delineamento de Plackett-Burman visando determinar os efeitos principais das variáveis estudadas, o nível de significância foi definido em 10% ($p < 0,1$) a fim de evitar uma análise conservadora que poderia levar à exclusão de variáveis relevantes mas não significativas ao nível de 5%.

A Tabela 18, que apresenta os efeitos dos fatores sobre a atividade da xilanase, indica que as variáveis temperatura, concentração de xilana e de sulfato de amônio - (NH₄)₂SO₄ - são estatisticamente significativas a 10% de significância, por apresentarem p-valor menor que 0,1.

Tabela 18. Resultados dos efeitos do delineamento Plackett & Burman.

	Efeitos	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Média	6,6	0,6	10,4	0,0000
Xilana (g.L ⁻¹)	3,5	1,5	2,4	0,0429
Ext.levedura (g.L ⁻¹)	-1,8	1,5	-1,2	0,2571
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	-1,4	1,5	-1,0	0,3595
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	-4,2	1,5	-2,9	0,0213
Peptona (g.L ⁻¹)	2,0	1,5	1,4	0,2042
pH	0,5	1,5	0,4	0,7201
Temperatura (°C)	7,2	1,5	4,9	0,0012

Analisando a Tabela 18, verifica-se que um incremento na temperatura e na concentração de xilana conduz a uma maior atividade, visto que os efeitos dessas variáveis foram positivos em relação à resposta: 3,5 para concentração de xilana e 7,2 para a temperatura. Estes resultados sugerem a necessidade de realização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para ser possível construir o modelo preditivo.

5.3.2. *Delineamento Composto Central Rotacional*

A realização do delineamento Plackett & Burman, descrito no item anterior, indicou que as variáveis temperatura, concentração de xilana e concentração de sulfato de amônio exercem efeito sobre atividade da xilanase produzida pela cepa de levedura AY₁₀, uma vez que, para estas variáveis, o p-valor encontrado foi menor que 0,1. De posse desses resultados, realizou-se um planejamento completo, nesse caso o delineamento composto central rotacional (DCCR), para que fosse construído um modelo matemático para a atividade enzimática.

Embora a concentração de sulfato de amônio tenha sido considerada significativa pela análise estatística, optou-se por não considerá-la no DCCR, pois esta exerce um efeito negativo de valor elevado se comparado às demais variáveis, o que não é interessante neste estudo. Portanto, fixou-se o valor deste componente em 1 g.L⁻¹, valor empregado nas etapas anteriores deste trabalho, a fim de minimizar este efeito. A alternativa de retirar o sulfato da

composição do meio foi descartada, pois este componente é necessário para o crescimento do microrganismo.

Neste planejamento também foram feitas análises de pH, biomassa e atividade nos seis pontos da fermentação de todos ensaios, possibilitando a construção das curvas desses parâmetros em relação ao tempo de fermentação.

Os resultados obtidos para o pH encontram-se na Tabela 19 e podem ser visualizados também pela Figura 11. Com exceção do ensaio 6, que apresentou os menores valores de pH, todos os ensaios obtiveram pH maior que 7,0 com apenas 24 horas de fermentação, atingindo valores elevados ao final desta. Isto se deve ao fato de que, assim como no PB, não foi adicionado tampão fosfato aos meios dos 11 ensaios realizados.

Tabela 19. Valores de pH encontrados para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Ensaio	pH					
	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	6,70	7,34	7,97	8,25	8,37	8,55
2	6,60	7,14	7,67	8,06	8,18	8,26
3	6,74	7,50	8,26	8,44	8,58	8,67
4	6,62	7,13	7,63	8,10	8,16	8,29
5	6,74	7,20	7,66	7,93	7,96	8,06
6	6,58	6,84	7,10	7,04	7,14	7,60
7	6,63	7,16	7,68	8,14	8,20	8,52
8	6,64	7,22	7,80	8,19	8,20	8,52
9	6,66	7,24	7,82	8,19	8,10	8,23
10	6,67	7,29	7,90	8,24	8,34	8,44
11	6,61	7,27	7,93	8,13	8,20	8,23

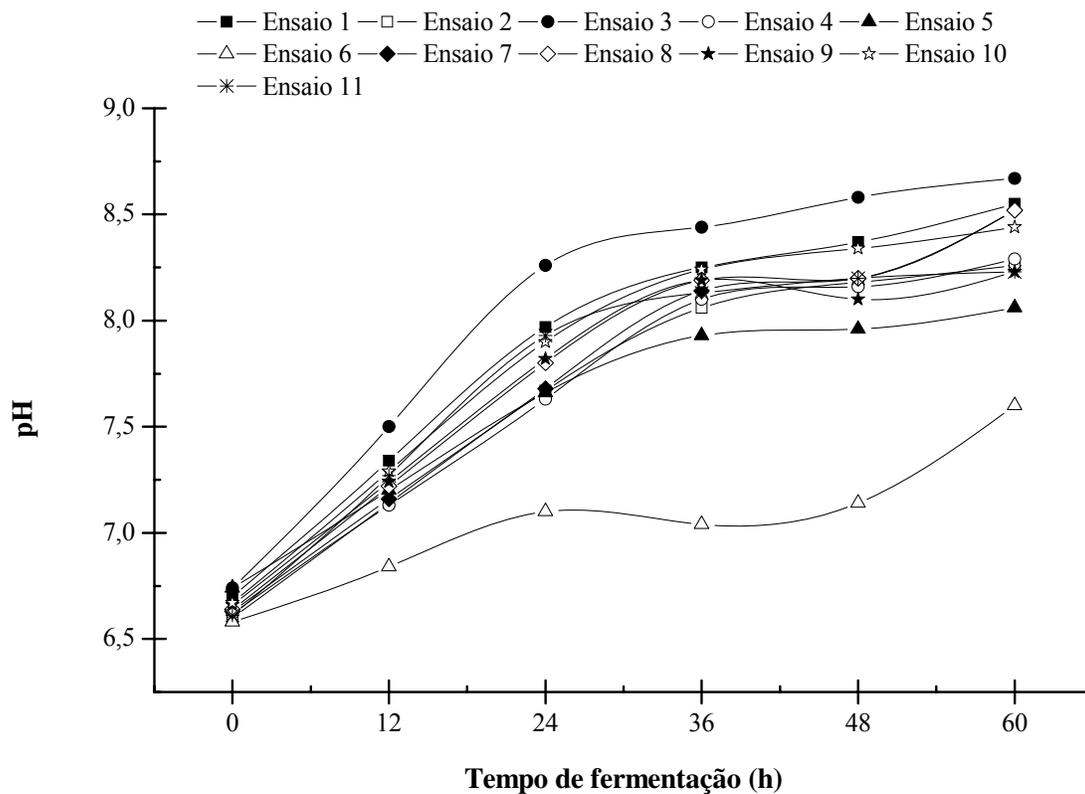


Figura 11. Comportamento do pH *versus* o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.

Os valores de biomassa estão expressos na Tabela 20, onde para cada ensaio tem-se a biomassa estimada nos pontos 0, 12, 24, 36, 48 e 60 horas de fermentação.

Tabela 20. Valores de biomassa encontrados para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Ensaio	Biomassa (g.L ⁻¹)					
	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	0,62	2,01	4,19	3,96	3,93	3,25
2	0,80	2,28	4,66	4,42	4,53	3,97
3	0,33	1,61	3,21	3,25	3,23	4,38
4	0,66	2,50	4,83	5,56	5,40	6,13
5	0,40	1,09	2,23	1,66	1,99	2,22
6	0,92	1,92	3,70	5,30	6,96	6,68
7	0,82	3,24	6,32	6,06	6,11	5,85
8	0,26	1,08	2,11	3,02	3,00	2,92
9	0,71	2,02	4,15	5,57	5,86	5,17
10	0,68	2,13	4,44	5,22	5,45	4,23
11	0,83	2,40	4,90	6,05	6,08	4,88

Analisando os resultados para biomassa, podemos observar que o menor crescimento foi obtido para o ensaio 5 e um crescimento acentuado, sobretudo após 24 horas de fermentação, foi encontrado para o ensaio 6. Estes resultados para esses dois ensaios podem ser função da concentração de xilana utilizada, visto que para o ensaio em que o nível de concentração foi máximo (ensaio 6) obteve-se uma biomassa elevada e, para aquele em que o nível foi mínimo (ensaio 5) obteve-se os menores valores de biomassa. Esta conclusão pode ser reforçada se observarmos as curvas dos ensaios 1 e 2. Para esses dois ensaios o nível de temperatura foi o mesmo (-1 que corresponde a uma temperatura de 25°C) e eles apresentaram perfis muito parecidos. No entanto, os valores de biomassa para o ensaio 2, onde o nível de concentração de xilana foi máximo, foram maiores que para o ensaio 1, onde utilizou-se o nível mais baixo desta mesma variável do DCCR.

Os ensaios 9, 10 e 11 apresentaram curvas muito próximas de acordo com a Figura 12, o que reforça a repetibilidade dos pontos centrais em termos de biomassa.

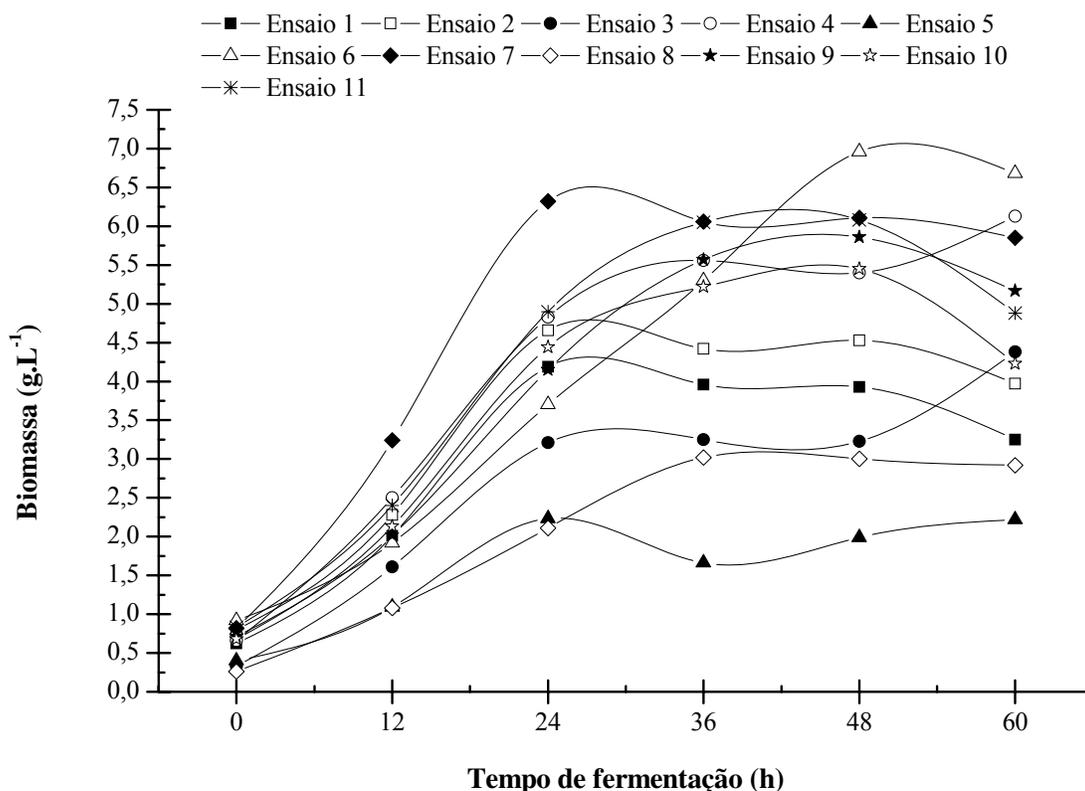


Figura 12. Gráfico da biomassa *versus* o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.

A Tabela 21 possui os valores de atividade para os 11 ensaios do DCCR em cada ponto da fermentação e, através da Figura 13, podemos visualizar as curvas da atividade em função do tempo para cada ensaio.

Pela Figura 13, podemos notar que os valores de atividade encontrados com 24 horas de fermentação para os pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) destacaram-se em relação aos demais. Houve um pico de atividade em 24 horas de fermentação, e ocorrendo posteriormente uma queda abrupta, chegando-se ao processo com atividades próximas a $30 \mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Esta ocorrência de pico de atividade foi a única obtida em todo este estudo e necessita estudos adicionais para encontrar possíveis explicações. De acordo com MOTTA, 2008, a enzima produzida pela cepa AY₁₀ é estável na faixa de pH de 3,5 a 6,0. Dessa forma, os altos valores de pH obtidos podem ser a causa para esta queda de atividade.

Tabela 21. Valores de atividade enzimática para os 11 ensaios realizados no DCCR para amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)						
Ensaio	Tempo de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48	60
1	0,05	6,90	21,60	20,68	25,29	23,66
2	0,04	5,99	19,38	23,56	20,76	24,28
3	0,00	2,16	7,64	5,49	7,71	17,00
4	0,01	3,03	8,18	7,32	7,47	11,73
5	0,01	4,00	10,88	14,00	15,74	16,94
6	0,18	7,85	18,38	18,81	25,52	25,52
7	0,12	5,21	12,20	10,17	13,09	15,53
8	0,05	3,58	8,42	6,15	13,96	18,50
9	1,52	13,52	62,53	28,28	26,61	26,82
10	2,25	16,95	69,45	27,85	24,83	27,09
11	1,02	15,65	65,03	29,00	26,02	25,00

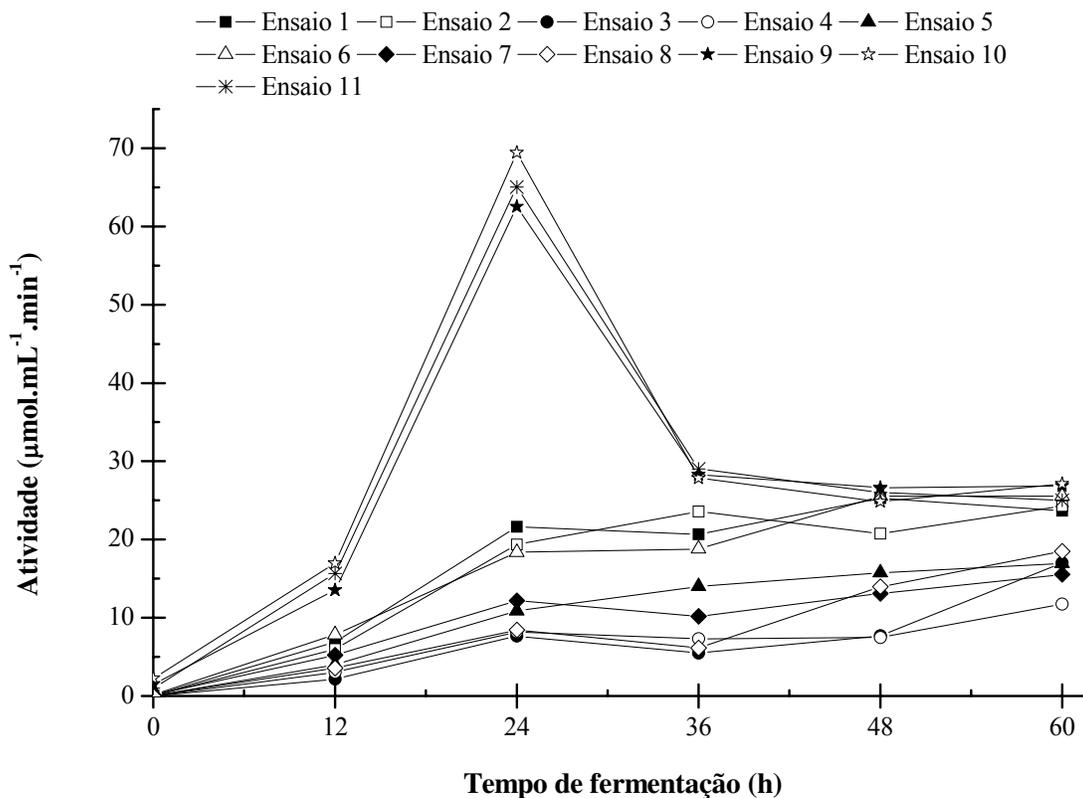


Figura 13. Gráfico da atividade *versus* o tempo de fermentação para os 11 ensaios do DCCR realizado.

A Tabela 22 apresenta a matriz do planejamento experimental realizado, com os valores codificados e reais, bem como as respostas obtidas para os 11 ensaios. Verificou-se que neste planejamento a atividade variou de 7,64 a 67,45 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e que o valor médio desta variável para os pontos centrais, onde obtiveram-se as atividades mais elevadas, foi de 65,00 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Os pontos centrais apresentaram uma pequena variação, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela 22. Matriz real e codificada do DCCR e as respostas obtidas.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Atividade (UI) 24 horas
	Xilana (g.L ⁻¹)	Temp. (°C)	Xilana (g.L ⁻¹)	Temp. (°C)	
1	-1	-1	13	26,5	21,60
2	1	-1	27	26,5	19,38
3	-1	1	13	33,5	7,64
4	1	1	27	33,5	8,18
5	-1,41	0	10	30	10,88
6	1,41	0	30	30	18,38
7	0	-1,41	20	25	12,20
8	0	1,41	20	35	8,42
9	0	0	20	30	62,53
10	0	0	20	30	67,45
11	0	0	20	30	65,03

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 23, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q. O nível de significância utilizado foi de 5%, embora tanto a 5% quanto a 10 % as variáveis consideradas estatisticamente significativas pela análise computacional tenham sido as mesmas.

As variáveis significativas, ou seja, aquelas que apresentaram p-valor inferior a 0,05 foram concentração de xilana quadrática e temperatura linear e quadrática.

Tabela 23. Coeficientes de regressão obtidos a partir do erro residual para valores codificados do DCCR.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	65,00	2,42	26,81	< 0,0001
Xilana (g.L-1) (L)	1,12	1,49	0,75	0,48703
Xilana (g.L-1) (Q)	-24,82	1,77	-13,99	< 0,0001
Temperatura (°C) (L)	-3,82	1,49	-2,57	0,04999
Temperatura (°C) (Q)	-26,99	1,77	-15,21	< 0,0001
Xilana (g.L-1) x Temperatura (°C)	0,69	2,10	0,33	0,75576

Na Tabela 24 estão expressos somente os coeficientes de regressão das variáveis consideradas significativas a 5% de significância.

Tabela 24. Coeficientes de regressão considerando somente os termos a $p < 0,05$.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	65,00	2,18	29,79	< 0,0001
Xilana (g.L-1) (Q)	-24,82	1,60	-15,54	< 0,0001
Temperatura (°C) (L)	-3,82	1,34	-2,86	0,02447
Temperatura (°C) (Q)	-26,99	1,60	-16,90	< 0,0001

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo com as variáveis codificadas, expresso pela Eq. 2.

$$Atividade = 65,00 - 24,82 \cdot Xilana(Q) - 3,82 \cdot Temperatura(L) - 26,99 \cdot Temperatura(Q) \quad \text{Eq. 2}$$

A equação para o modelo real (Eq. 3) foi obtida através do software, da mesma forma que obtivemos a equação para o modelo codificado. No entanto, no caso do modelo real, foram utilizadas as variáveis reais em substituição às codificadas e, neste caso, não podemos excluir os parâmetros que não são estatisticamente significativos, pois os valores reais são normalmente grandes e acabam afetando o valor previsto.

$$\text{Atividade} = -2046,114 + 19,332 \cdot \text{Xilana}(L) - 0,500 \cdot \text{Xilana}(Q) + 128,828 \cdot \text{Temperatura}(L) - 2,175 \cdot \text{Temperatura}(Q) + 0,028 \cdot \text{Xilana}(L) \cdot \text{Temperatura}(L) \quad \text{Eq. 3}$$

Através da análise da Tabela 25 e da Tabela 26, ANOVA para todos os termos e somente para os termos significativos, respectivamente, podemos observar que ambos os valores de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão (67,70 e 139,01) são significativos. Ou seja, não há necessidade de adicionar ao modelo os coeficientes das variáveis independentes que não foram estatisticamente significativas.

Ainda de acordo com as Tabela 25 e Tabela 26, verificamos um alto valor de variação explicada, tanto na análise de variância de todos os termos quanto na análise dos significativos. A porcentagem de variação explicada sofreu uma pequena diminuição, 98,54 para 98,35%, devido à exclusão de parâmetros do modelo. Ao excluir parâmetros do modelo, aumentamos o grau de liberdade dos resíduos, aumentando o $F_{\text{calculado}}$.

Tabela 25. ANOVA para a atividade enzimática considerando todos os termos do modelo.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	5.969,33	5	1.193,87	67,70
Resíduo	88,18	5	17,64	
Total	6.057,51	10		

% variação explicada (R^2) = 98,54; $F_{5; 5; 0,05} = 5,05$

Tabela 26. ANOVA para a atividade enzimática considerando somente os termos estatisticamente significativos (p-valor <0,05).

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalculado
Regressão	5.957,51	3	1.985,84	139,01
Resíduo	100,00	7	14,29	
Total	6.057,51	10		

% variação explicada (R^2) = 98,35; $F_{3;7;0,05} = 4,35$

Com o modelo definido, puderam-se calcular os valores previstos pelo modelo e determinar os desvios e desvios relativos quando comparados com os valores experimentais (Tabela 27). Pode-se observar que os desvios foram baixos na região na região desejada em que as atividades estão maximizadas (pontos centrais: ensaios 9, 10 e 11). No entanto, nos ensaios onde os valores da resposta foram mais baixos, os desvios relativos foram bem maiores, atingindo -44%, mostrando que para valores baixos de atividade o modelo não se aplica tão bem quanto para valores mais elevados.

Tabela 27. Resultados experimentais para os 11 ensaios e as respostas previstas utilizando o modelo e seus desvios.

Ensaio	Valores experimentais	Valores previstos pelo modelo	Desvios	Desvios relativos (%)
1	21,60	17,01	4,59	21%
2	19,38	17,01	2,37	12%
3	7,64	9,37	-1,73	-23%
4	8,18	9,37	-1,19	-15%
5	10,88	15,66	-4,78	-44%
6	18,38	15,66	2,72	15%
7	12,20	16,73	-4,53	-37%
8	8,42	5,95	2,47	29%
9	62,53	65,00	-2,47	-4%
10	67,45	65,00	2,45	4%
11	65,03	65,00	0,03	0%

A Figura 14 apresenta o comportamento dos valores experimentais frente aos valores preditos, onde se pode observar que há uma boa concordância entre eles, sendo possível verificar a tendência através da superfície de resposta. Além disso, fica evidente que os valores de atividade para os pontos centrais foram significativamente maiores que para os demais ensaios.

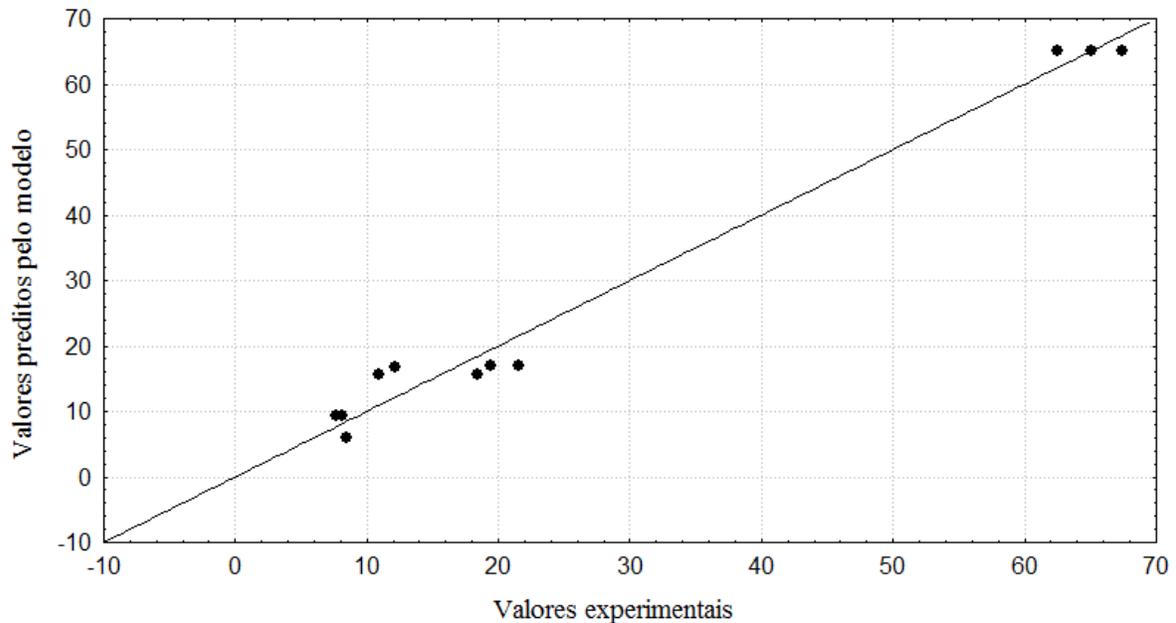


Figura 14. Valores experimentais de atividade em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

Pela Figura 15 pode-se observar que os erros de ajustamento estão independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

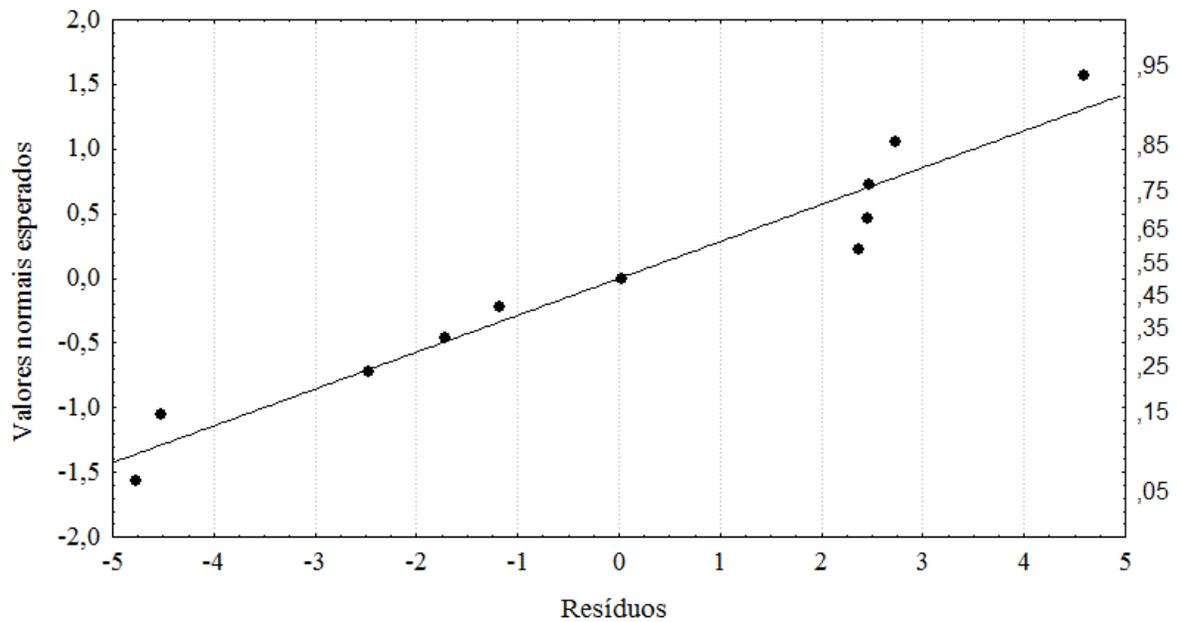
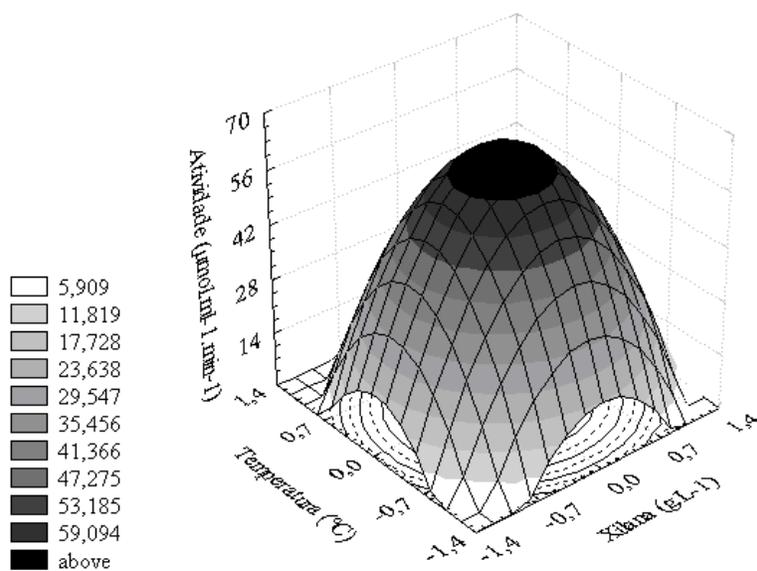
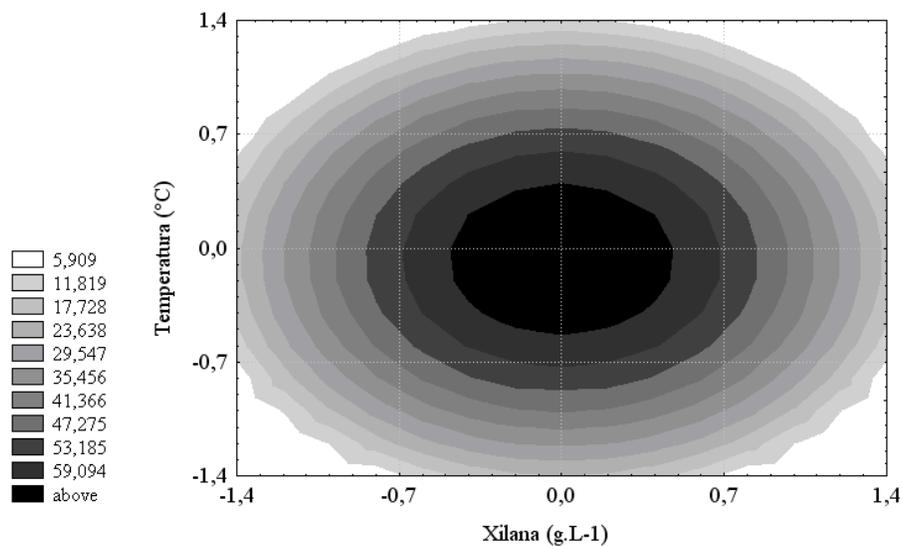


Figura 15. Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade.

De acordo com a ANOVA, o modelo foi altamente significativo e, através da análise de comportamento dos valores predito em função dos experimentais e da distribuição dos resíduos, foi confirmada a confiabilidade do modelo. Portanto, foi possível construir a superfície de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática em função da concentração de xilana e da temperatura (Figura 16), onde se visualiza que os maiores valores da resposta foram encontrados para os pontos centrais - concentração de xilana de 20 g.L^{-1} e temperatura de 30°C .



(a)



(b)

Figura 16. Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da xilanase em função da concentração de xilana e da temperatura.

Embora as condições ótimas encontradas tenham sido as mesmas utilizadas nos pontos centrais, dispensado a obrigatoriedade da realização de novos ensaios para a validação do modelo, optou-se pela realização de fermentações com as condições otimizadas. Embora as atividades enzimáticas para os três pontos centrais tenham sido muito próximas entre si, estas ficaram muito distantes daquelas encontradas para os demais ensaios.

Foram, portanto, realizadas três novas fermentações, respeitando os procedimentos de preparação de inóculo anteriores a fim de minimizar as possíveis diferenças entre essas fermentações e as realizadas no DCCR. Os valores de pH, biomassa e atividade da xilanase encontrados com a repetição dos pontos centrais encontram-se na Tabela 28. Nesse caso as atividades obtidas foram inferiores àquelas dos pontos centrais do planejamento, sendo essa diferença possivelmente ocasionada pela dificuldade de se produzir inóculos com a mesma carga microbiana, afetando a biomassa inicial da fermentação.

Tabela 28. Valores de pH, biomassa e atividade enzimática em função do tempo de fermentação para as três repetições dos na condição do ponto central.

Tempo de fermentação	pH			Biomassa (g.L ⁻¹)			Atividade (UI)		
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Rep.1	Rep.2	Rep. 3
0	6,78	6,73	6,68	0,38	0,44	0,41	1,52	2,25	1,65
12	7,31	7,26	7,19	2,65	3,13	2,37	12,55	9,94	10,56
24	7,81	7,76	7,73	3,53	3,57	3,20	49,51	46,17	46,53
36	7,93	7,95	8,01	3,51	3,55	3,42	26,55	23,22	25,85
48	8,11	7,95	8,08	3,54	3,43	3,33	22,74	19,53	18,98
60	8,18	8,14	8,16	3,47	3,63	3,33	19,89	18,34	16,73

Os resultados de atividade (Figura 17) permitem concluir com mais segurança que altos valores de atividade são obtidos nas condições centrais do planejamento e a 24 horas de fermentação.

Na Tabela 29 estão expressos valores de atividade de xilanase produzida por nove espécies diferentes de fungos, utilizados em trabalhos distintos. Comparativamente, podemos concluir que a atividade enzimática obtida neste trabalho a partir das condições otimizadas foi bastante significativa em relação a estudos semelhantes.

Tabela 29. Comparação da produção de xilanase por fungos.

	Atividade enzimática (UI)	Referência
<i>Aspergillus niger</i> KK2	620	MIN <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus fumigatus</i>	125	LENARTOVICZ <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	20	SHAH <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus ochraceus</i>	45	BISWAS <i>et al.</i> , 1990
<i>Aspergillus nidulans</i> KK-99	40	TANEJA <i>et al.</i> , 2002
<i>Trichoderma viride</i>	72	GOMES <i>et al.</i> , 1992
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	245	CHRISTAKOPOULOS <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 1171	130	ADSUL <i>et al.</i> , 2004
<i>Emericella nidulans</i> NK-62	362	KANGO <i>et al.</i> , 2003

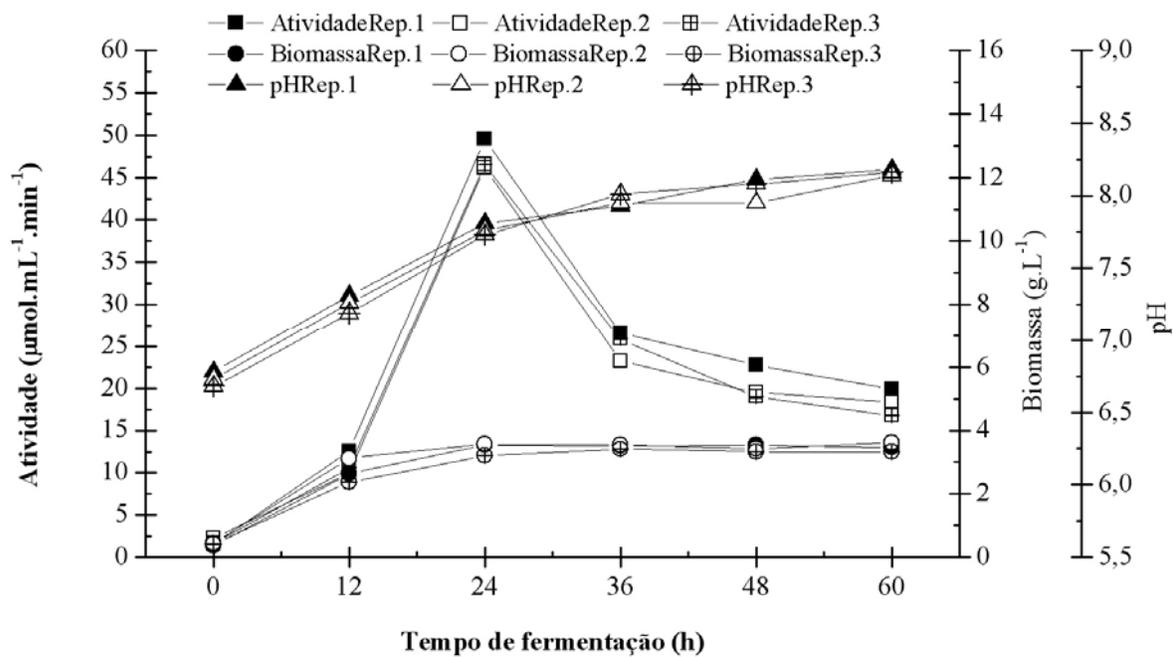


Figura 17. Curvas de pH, biomassa e atividade enzimática em função do tempo de fermentação para as três repetições dos na condição do ponto central.

6. CONCLUSÃO

Através da análise dos dados experimentais desse trabalho, foi possível concluir que, sob as mesmas condições de fermentação, a cepa de levedura AY10 apresenta uma atividade mais elevada que a AAD5 num menor tempo, o que levou à escolha da AY10 para realização dos estudos de otimização.

Os resultados obtidos permitiram, além disso, concluir que a presença do tampão fosfato no meio de cultura da levedura tem efeito negativo tanto sobre o crescimento da biomassa quanto sobre a produção e atividade da xilanase, uma vez que sem a adição deste tampão foram obtidos valores de biomassa mais elevados e uma atividade quase 10 vezes maior.

O delineamento Plackett & Burman, etapa seguinte ao teste da influência do tampão fosfato, investigou o efeito de sete variáveis (concentração de componentes do meio, pH e temperatura) e seus resultados demonstraram, estatisticamente, que xilana (g.L^{-1}), sulfato de amônio (g.L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) exercem influência sobre a atividade da xilanase (UI). Além disso, foram encontrados efeitos positivos para as variáveis temperatura e concentração de xilana, indicando que maiores valores dessas variáveis favorecem a atividade enzimática, e um efeito negativo para a concentração de sulfato de amônio. Devido a este efeito negativo, que vai de encontro ao objetivo deste estudo, optou-se por não considerar a concentração de sulfato de amônio do planejamento seguinte, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

A realização do DCCR permitiu a obtenção de um modelo preditivo para a atividade da xilanase e a construção da superfície de resposta, onde os maiores valores da variável dependente foram observados nos pontos centrais do planejamento. Dessa forma, concluiu-se que a utilização de 20 g.L^{-1} de xilanase no meio de crescimento e o uso de uma temperatura de 30°C na fermentação permitem obter o mais alto valor para a atividade ($67,45 \text{ UI}$) dentro da faixa estudada. Novas repetições nas condições dos pontos centrais permitiram a confirmação desses resultados.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A utilização das condições otimizadas obtidas neste trabalho, aliadas à ferramenta de modificação genética da levedura, podem ser empregadas na investigação da produção de compostos alcoólicos em trabalhos futuros. Outro objeto importante para os estudos atuais seria o emprego de meios industriais de baixo custo na produção de xilanase, visto que os meios sintéticos possuem custo elevado.

Além disso, seria interessante a investigação da queda de atividade enzimática que ocorreu após 24 horas de fermentação em todo este estudo, o que poderia ser feito através da realização de fermentações sob controle de pH, agitação e aeração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.*, v. 57, p. 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.
- BAKIR, U., YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- β -1,4- xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enz. Microb. Technol.* 29(6): 328-334, 2001.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeast Characteristics and Identification. 2nd ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1200 pp, 1990.
- BEG Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S.; Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, vol. 56, p. 326 – 338, 2001.
- FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Rev. Bras. Farm.*, v. 81, p. 48-56, 2000.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S.; Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, vol. 56, p. 326 – 338, 2001.
- 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.*, v. 35, p. 244-251, 1990.

- BOX, GE.P. HUNTER, W.G., R, J.S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and MaZel Building, New York: Wiley & Sons Inc., 653 p, 1978.
- 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.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C.; Planejamento de experimentos usando o Statistica. E-Papers Serviços, Rio de Janeiro, 260 p., 2003.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 14, p. 111-123, 2001.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. Quim. Nova, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Quim. Nova, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CHRISTAKOPOULOS, P., NERINCKX, W.; KEKOS, D.; MACRIS, B.; CLAEYSSSENS, M. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. J. Biotechnol., v. 51, p. 181-189, 1996.
- COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-Dxylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol. Appl. Biochem., London, v. 17, p. 259-289, 1993.

- 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.
- 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, Cell wall. Endereço eletrônico: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>. Acessado em 02/11/2006.
- GEOK, L. P.; RAZAK, C. N. A.; RAHMAN, R. N. Z. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Isolation and screening of and extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 73-77, 2003.
- GESSESSE, A.; MAMO, G. Purification and characterization of two raw starch degrading thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme Microbiology Technology, v. 25, n. 3, p. 433-438, 1999.
- 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.
- GOMES, D.J.; GOMES, J. ; STEINER, W. Factors influencing the induction of endoxylanase by *Thermoascus aurantiacus*. Journal of Biotechnology, 33: 87 – 94, 1994.
- GOMES, I., GOMES, J.; STEINER, W., ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 36, p. 701-707, 1992.

- HALTRICH, D. *et al.* Production of fungal xylanases. *Bioresour. Technol.*, Kidlington, v. 58, p. 137-161, 1996
- HAWKSWORTH, D.I. Why study tropical fungi? In: Watling, R.; Frankland, ^aM.; Ainsworth, A.M.; Isaac, S.; Robinson, C.H. (ed.) *Tropical mycology vol.2: Micromycetes*, Cambridge: Cabi Publishing, 2002.
- HAWKSWORTH, D.I. Why study tropical fungi? In: Watling, R.; Frankland, ^aM.; Ainsworth, A.M.; Isaac, S.; Robinson, C.H. (ed.) *Tropical mycology vol.2: Micromycetes*, Cambridge: Cabi Publishing. Kirsop, B. E.; Kurtzman, C. P. 1988. *Yeast*. Cambridge University Press, Cambridge. 233 pp, 2002.
- HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. 2006. 186 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.
- HOJO, O. Estudo sobre a Produção de Penicilina G Ache por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. Tese Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, 229p, 1997.
- 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.
- JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3^a ed. Editora Acribia, 804 p., 1992
- JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases, 1996. Endereço eletrônico: http://www2.biotech.wisc.edu/jeffries/xylanase_review/xyl_rev.html. Acessado em: 15/06/2006.
- JOHSON-GREEN, P. *Introduction to food biotechnology*. 1. ed. New York: CRC Press LLC, 293 p., 2002.

- KADOWAKI, K. M.; SOUZA, C.G.M.; SIMÃO, R.C.G.; PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 66, p. 97-106, 1997.
- KANGO, N., AGRAWAL, S. C.; JAIN, P. C. Production of xylanase by *Emericella nidulans* NK-62 on lowvalue lignocellulosic substrates. World J. Microbiol. Biotechnol., v. 19, p. 691-694, 2003.
- KARNI, M., DEOPURKAR, R. L. AND RALE, V. B. β -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars agricultural residues. World J. Microbiol. Biotechnol., 9:475-478, 1993.
- KATO, Y.; NEVINS, D. J. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl-a-L-arabinofuranosyl)-(1,3)-O-B-D-xylanopyranosil-(1,4)-D-xylanopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. Carbohydrate Res., 137:139-150, 1985.
- KO, W. H.; WANG, I. T.; ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil Biology & Biochemistry, v. 37, p. 597-599, 2005.
- KULKARNI, P. P.; KADAM, A. J.; MANE, R. B.; DESAI, U. V.; WADGAONKAR, P. P. Demethylation of methyl aryl ethers using Pyridine hydrochloride in solvent-free conditions under microwave irradiation. Journal of Chemical Research (S), p. 394-395, 1999.
- LEE, S.; LEE, J. Insoluble dye substrate for screening and assay of xylan-degrading enzymes. Journal of Microbiological Methods, vol. 29, p. 1 – 5, 1997.
- LENARTOVICZ, SOUZA, V., C. G. M. D.; MOREIRA, F. G.; PERALTA R. M. Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. J.Basic Microbiol., v. 6, p. 388-395, 2002.

- MACIEL, G. M.; Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- MAGEE, R.J., KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 32:61-93, 1985.
- MIN, B. J.; PARK, Y. S.; KANG, S. W.; SONG, Y. S.; LEE, J. H.; PARK, C.; KIM, C. W.; KIM, S. W. Statistical optimization of medium components for the production of xylanase by *Aspergillus niger* KK2 in submerged cultivation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* vol.12, p. 302-307, 2007.
- MONTGOMERY, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, New York, 1991, 326 p.
- MOTTA, F. B. Triagem, seleção, produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 77 p. 2008.
- NISHITANI, K.; NEVINS, D. J. Enzymatic analysis of feruloylated arabinoxylans (Fexaran) derived from *Zea mays* cellwalls I. Purification fo novel enzymes capable of dissociating fezaran fragments from *Zea mays* coleoptile cell wall. *Plant Physiol.*, 87:883-89, 1988.
- NSEREKO, V.L.; MORGAVI, D.P.; DHIMAN, T.R. Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzyme prior to feeding. *Animal Feed Science and Technology*, v.101, p.115-125, 2002.
- OLIVEIRA, L. A. Fermentação extrativa de xilanase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia

- Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 91 p. 2003.
- ONYSKO, K. A., Biological bleaching of chemical pulps: A review. *Biotechnol. Adv.*, 11:179-198, 1993.
- 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.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, vol.33, p. 305-325, 1946.
- 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.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F.; Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª Ed. Campinas – SP, 2005.
- ROSE, A. H.; HARRISON, J. S.; **Biology of yeasts**, Academic Press, Londres; 423 p; 1987.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 390-393, 2007.
- SHAH, A. R. & MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem*, v. 40, p. 1763-1771, 2005

- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001
- SHULER, M. L.; KARGI, F.; *Bioprocess Engineering: basic concepts*; Prentice Hall; New Jersey; 479 p.; 1992.
- 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 cellulase and b-xylosidase while maintaining low protease production. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 883-890, 1991.
- SOUZA, D.F.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaraii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 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.
- TANEJA, K., GUPTA, S.; KUHAD, R. C. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour. Technol.*, v. 85, p. 39-42, 2002.
- TENKANEN, M. ; PULS, J. ; POUTANEN, K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14 : 566-574, 1992.
- TORNAI-LEHOCZKI, J. ; PETER, G. ; DLAUCHY , D. *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *Inter. J. of Food Microbiology*, (86): 189-200, 2003.
- VAN DER BROECK, H. C.; DE GRAFF, L. L.; HILLE, J. D. R.; VAN OUYEN, A. J. J.; VESSER, J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and

use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper productions. European Patent Appl. 90/202, 020, 1990.

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

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4 Xylanase in *Microorganisms: Functions and Applications* – 317, 1988.

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

ZANOTTO, S. P.; LISBÔA, L. U. S.; NASCIMENTO, M. G.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MARTINS, M. K.; PEREIRA, J. O. Seleção de fungos isolados de plantas da região amazônica, fornecedores de lipases para biotransformações. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 16., 2007, Curitiba. *Anais...* Curitiba: CIETEP, 2007.