

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Penicillium crustosum* POR
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO NO
BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA

Nyéssia Fernanda de Sousa Silva

Cascavel-PR

Novembro/2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Penicillium crustosum* POR
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO NO
BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA

Dissertação apresentada ao
Programa *Stricto Sensu* em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná – UNIOESTE como
requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina
Kimiko Kadowaki
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia
R. Simões

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S581o Silva, Nyéssia Fernanda de Sousa
Otimização da produção de xilanase de *Penicillium crustosum* por planejamento experimental e aplicação no biobranqueamento da polpa celulósica. / Nyéssia Fernanda de Sousa Silva.— Cascavel, 2014.
43p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia R. Simões

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2014
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Plackett-Burman. 2. Delineamento composto central rotacional. 3. Biobranqueamento. 4. Xilanases. 5. Fungos filamentosos. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 660.6

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Penicillium crustosum* POR
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO NO
BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

por

Nyéssia Fernanda de Sousa Silva

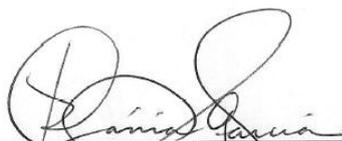
FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA EM 28 DE NOVEMBRO DE 2014.



PROFA. DRA. MARINA KIMIKO KADOWAKI

PCF-UNIOESTE (ORIENTADORA)



PROFA. DRA. RITA DE CÁSSIA GARCIA SIMÃO

TITULAR INTERNO (UNIOESTE)



PROFA. DRA. SAMARA ERNANDES

TITULAR EXTERNO (UTFPR)



PROF. DR. EDUARDO BORGES DE MELO

COORDENADOR – PCF-UNIOESTE

Cada pensamento,
Cada palavra,
Cada sussurro,
Cada porém de estar aqui agora,
Me faz acreditar
Que vivemos muito além do que pensamos
Cada amanhecer,
Cada entardecer,
Cada anoitecer,
Me faz perceber que a vida é muito mais,
Do que somos capazes de imaginar.
Cada lágrima,
Cada dor,
Cada momento,
Me faz entender que por mais que fugimos,
O acaso sempre nos encontra,
Pois algumas coisas são certas
E uma delas é de que
Sofrer também faz parte da história de cada um.
Cada vitória,
Cada sorriso,
Cada nova vida,
Me faz amar as melhores coisas que existem,
E a superar aquelas
Que por mais que aparentam invencíveis,
Acabam por si,
Quando abraçamos a fé.

Dedico:
Ao meu esposo **Alysson F. Briel**,
pelo seu amor e compreensão nos
momentos de solidão.
Á minha querida **mãe** e **irmã**,
presentes de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, que sempre guiou minha vida e concedeu-me paciência, sabedoria, coragem e força para atingir meus objetivos. Que não se descuidou nenhum minuto dos meus passos, em todas as viagens, sempre soube que mesmo sozinha, estavas do meu lado sempre!

Ao meu amado esposo, Alysson Fernando Briel, que me ajudou em todos os momentos, que compreendeu minhas ausências, que me permitia descansar em seus braços, ouvia todos os meus anseios, e tornou-se meu fiel conselheiro.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marina K. Kadowaki, pela oportunidade dada, serei grata eternamente, por toda a sua paciência em ensinar, pelos cuidados, pelo conhecimento transmitido, foi muito bom saber que tive sua contribuição em minha vida profissional e pessoal.

A minha co - orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia R. Simões, pelas dúvidas sanadas e paciência em desvendar o misterioso mundo da bioestatística e planejamentos experimentais. Por toda a luz concedida durante essa caminhada.

Aos colegas de laboratório Sandra, Paulo, Vanessa, Juliana, Luciana, Alessandra, Diandra, Fabíola, Taiomara, Laysa, Jaina. Muito bom ter conhecido vocês e serei grata pelos ensinamentos compartilhados, dúvidas sanadas, bolinhos e risadas.

Á querida Carla, que foi a primeira pessoa que conheci no laboratório e foi a minha mentora nos primeiros passos, jamais esquecerei aquele 02/01/2013 e nessa trajetória do mestrado tornou-se tão especial, contribuiu de todas as maneiras com esse trabalho, agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida.

A prof^a. Dr^a. Adriana Knob e suas alunas pela contribuição nesse trabalho, por todo o carinho em me receber na UNICENTRO e por toda a ajuda que me proporcionou.

Ao casal de amigos Leandro, Daiane e o pequeno anjo Vítor, que sempre me receberam com todo carinho e me hospedaram com tanta presteza, inúmeras vezes que precisei, fazendo do lar deles a minha segunda casa.

A todos que tive a honra de dividir esse trajeto.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Fungos	3
2.2 Xilanases	5
2.2.1 Estruturas da parede celular vegetal e enzimas envolvidas em sua degradação.....	5
2.2.2 Composição química e degradação da hemicelulose.....	9
2.2.3 Produção de xilanases por micro-organismos	10
2.2.4 Aplicações industriais de xilanases.....	12
2.2.5 Branqueamento enzimático	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ARTIGO CIENTÍFICO	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Micro-organismo.....	24
2.2 Identificação taxonômica do micro-organismo.....	25
2.3 Influência de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase por <i>P. crustosum</i> em cultivo líquido.....	25
2.4 Condições de cultivo do fungo.....	25
2.5 Seleção de componentes do meio de cultivo de <i>P. crustosum</i> através do Delineamento Plackett-Burman (DPB).....	26
2.6 Otimização da produção de xilanase por <i>P. crustosum</i> utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	26
2.7 Determinação da atividade de xilanase.....	27
2.8 Determinação do pH e estabilidade ao pH da xilanase produzida pelo fungo <i>P. crustosum</i>	27

2.9	Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade da xilanase do fungo <i>P. crustosum</i>	28
2.10	Tratamento da polpa celulósica com a xilanase de <i>P. crustosum</i>	28
2.10.1	Obtenção da polpa celulósica.....	28
2.10.2	Tratamento enzimático da polpa de celulose.....	28
2.10.3	Determinação do número Kappa na polpa.....	29
2.10.4	Determinação da viscosidade.....	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1	Seleção dos componentes do meio de cultivo para a produção de xilanase do <i>P. crustosum</i> utilizando Delineamento Plackett-Burman (DPB).....	30
3.2	Otimização da produção de xilanase do <i>P. crustosum</i> através de DCCR e Análise de Superfície de Resposta.....	32
3.3	Influência do pH e estabilidade ao pH da xilanase de <i>P. crustosum</i>	35
3.4	Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade de xilanase do fungo <i>P. crustosum</i>	36
3.5	Aplicação da xilanase de <i>P. crustosum</i> no bi branqueamento da polpa de celulose.....	37
4.	CONCLUSÃO	39
5.	REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

- FIGURA 1** *Penicillium crustosum*; CCRC 33166, fiálides..... 5
- FIGURA 2** *Penicillium crustosum* (CCRC 33166). A) Crescimento em Meio Czapek Yeast Agar (MYA) e B) Meio Ágar Extrato de Malte (MEA)..... 5
- FIGURA 3** Esquema da estrutura da parede celular vegetal e seus componentes, presente em resíduos agroindustriais..... 6
- FIGURA 4** Representação da estrutura da xilana vegetal e os pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil ; Arab, L-arabinofuranose; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil, D-xilose..... 7
- FIGURA 5** Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Eucalyptus grandis*..... 9
- FIGURA 6** Fluxograma do processo convencional de branqueamento de celulose. Adaptado do treinamento operacional da Votorantim celulose e papel.....15

ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURA 1** Variáveis significativas no Delineamento Plackett-Burman - Diagrama de Pareto.....31
- FIGURA 2** Superfícies de Respostas para produção de xilanase por *P. Crustosum*. Interações entre Palha de milho x KH_2PO_4 (A), Palha de Milho x pH (B) e KH_2PO_4 x pH (C).....34
- FIGURA 3** Influência do pH sobre a atividade da enzima xilanase do fungo *P. crustosum*.....35
- FIGURA 4** Influência da temperatura sobre a atividade da enzima xilanase do fungo *P. crustosum*.....36
- FIGURA 5** Estabilidade da enzima ao pH (A) e termoestabilidade da xilanase produzida pelo *P. crustosum* (B)37

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

- TABELA 1** Valores codificados e reais das variáveis do DCCR26
- TABELA 2** Matriz do Delineamento Plackett – Burman (DPB-12) para a seleção de fatores que afetam a produção de xilanase produzida por *P. crustosum*.....31
- TABELA 3** Planejamento experimental para otimização da produção de xilanase por *P. crustosum* utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....32
- TABELA 4** Análise de Variância (ANOVA) para os parâmetros de metodologia de superfície e resposta para o modelo reduzido de segunda ordem.....33
- TABELA 5** Branqueamento da polpa kraft tratada com xilanase produzida por *P. crustosum*.....38

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Penicillium crustosum* POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO NO BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA

RESUMO

As xilanases são complexos enzimáticos pertencentes ao grupo das glicosidases, e são capazes de atuar em vários sítios da cadeia do xilano e degradá-lo em xilooligossacarídeos, xilotrioses, xilobioses e xiloses. As xilanases são utilizadas nos diversos setores industriais, como biobranqueamento de celulose, na melhoria da textura e do volume do pão, clareamento de sucos e vinho, melhoria do valor nutricional de ração de animais monogástricos. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de xilanase pelo *Penicillium crustosum* utilizando o Delineamento Plackett-Burman (DPB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), bem como aplicação da xilanase otimizada no processo de branqueamento da polpa de celulose. A seleção dos componentes de meio de cultivo: NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl ; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, extrato de levedura, palha de milho e pH inicial foi realizada utilizando DPB-12 em condições de cultivo líquido estacionário a 28°C por 6 dias. As variáveis palha de milho, KH_2PO_4 , e pH apresentaram efeitos significativos em $p < 0,10$ por DPB. A análise estatística dos resultados obtidos com DCCR exibiram as três variáveis (KH_2PO_4 0,15 %, palha de milho 2% e pH inicial 6,0) que mostraram efeitos significativos em $p < 0,05$, e a produção máxima de xilanase foi de 50 U/mL, 14 vezes superior em comparação à atividade enzimática antes da otimização. O tratamento da polpa celulósica com a xilanase de *P. crustosum* mostrou uma redução significativa do número kappa em 5,27 pontos e eficiência Kappa de 35,04%. Dessa forma, evidencia-se o potencial de aplicação da xilanase produzida por *P. crustosum* no processo de branqueamento da polpa kraft de Eucaliptos para indústria de papel e celulose.

Palavras-chave: Plackett-Burman, Delineamento Composto Central Rotacional, Biobranqueamento, xilanases, fungos filamentosos

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os bioprocessos atingiram dimensões incalculáveis, apresentando total relevância social e econômica, principalmente ao empregar recursos naturais renováveis, visto que são abundantes no Brasil. Com esse crescimento e desenvolvimento tecnológico, houve a necessidade de implementar tecnologias com uso de materiais renováveis, visando a preservação ambiental. Além disto, uma grande variedade de metabólitos obtidos desses processos biotecnológicos industriais, em substituição aos processos químicos convencionais, demonstraram inúmeras vantagens, o que estimula a realização de inúmeros trabalhos de investigação científica.

Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industriais, em amplo desenvolvimento, é a obtenção de enzimas microbianas, devido ao potencial biotecnológico de aplicações em diversos segmentos industriais. A aplicação de xilanases nesses segmentos são promissoras. Um exemplo são as indústrias de celulose e papel, que estão modificando a maneira de tratar a matéria – prima, e escolhendo por alternativas que possam reduzir a carga tóxica de seus efluentes. Nessas indústrias, emprega-se o cloro como agente químico branqueador. Adicionando xilanases (EC 3.2.1.x) nesse processo, reduziria em até 20% o emprego desse agente químico no branqueamento da polpa de papel. As xilanases podem ser empregadas também, nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, como na hidrólise de materiais ricos em xilano, resultando a xilose e outros xilooligossacarídeos como produtos, e que podem ser convertidos, biotecnologicamente, a xilitol, um adoçante empregado nessas indústrias. As xilanases são empregadas também nas indústrias de panificação e processos de extração da polpa de frutos e vegetais.

Outro aspecto abordado neste trabalho é o emprego de ferramentas estatísticas para planejamento e análise dos resultados. Ao utilizar-se de ferramentas estatísticas, pode-se extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, considerando um número reduzido de experimentos, reduzindo tempo de bancada, quantidade de reagentes e custo do processo.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo geral otimizar a produção de xilanase por *Penicillium crustosum*, utilizando planejamento estatístico e avaliar sua potencial aplicação nos processos de branqueamento da celulose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos

Nas últimas décadas, a utilização de fungos em processos biotecnológicos vem aumentando, devido à produção de enzimas com características físico-químicas variadas e com grande potencial na aplicação industrial. A capacidade de síntese em grande escala, como a facilidade com que são secretadas para o meio externo constituem algumas dessas características (IWASHITA, 2002; PAPAGIANNI, 2004).

Os fungos possuem propriedades diferenciais em relação à outros micro-organismos, ao secretarem suas exoenzimas, como amilases, pectinases, xilanases, celulasas e ligninases, que hidrolisam as macromoléculas presentes no substrato até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas através da membrana.

Os fungos formam um vasto grupo de organismos classificados em um reino próprio, denominado Fungi, pertencente ao Domínio Eukaryota. Neste grupo organismos de dimensões consideráveis, não só estão incluídos, os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. O número de espécies conhecidas de fungos é estimado em pelo menos 74.000, sendo a maioria terrestre, mas talvez existam até 1,5 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda não foi identificada, estudada e descrita pelos micologistas (HAWKSWORTH et al., 1995; HAWKSWORTH, 2001). Assim, a prospecção de enzimas de interesse industrial em fungos de solo brasileiro e resíduos ainda é um tema pouco explorado e de potencial interesse biotecnológico.

Os fungos filamentosos, em virtude de sua presença em vários ecossistemas e habitats, podem ser cultivados em meios de cultura com relativa simplicidade de composição, pela facilidade de manuseio, suas condições de cultivo são facilmente controladas, ocupando pouco espaço e crescem na presença de fonte de carbono associada ao calor e umidade (TREVISAN, 2004).

O gênero *Penicillium* possui forma anamorfica (fases assexuadas ou mitótica) de ascomicetos, classificados na família Trichomaceae, Ordem Eurotiales, Classe Eurotiomycetes, Sub-classe Eurotiomycetidae (Index Fungorum 2010). Como características, a produção de fiálides e conídios em cadeias secas (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996). Fiálides são células especializadas em produzir propágulos vegetativos (conídios), que são formados por mitose e podem surgir diretamente das vesículas (unisseriados) ou são produzidos em uma segunda camada de células, chamadas de "métulas" (bisseriados), sendo ambas - fiálides e métulas - formadas simultaneamente (CHALFOUN e BATISTA, 2003). São fungos conidiais sapróbios comuns, agentes dos mofos ou bolores azuis que ocorrem em diferentes substratos, espécies desse gênero, causam bolores em citrus, podridões de fruto muito comuns na fase de pós-colheita (KIMATI et al., 1978).

O micro-organismo selecionado para este estudo, *Penicillium crustosum*, cresce em uma vasta variedade de substratos (Figura 1 e 2), permitindo que características morfológicas sejam identificadas por microscópio. O fungo apresenta habilidade de crescer em Meio Czapek Yeast Agar (MYA), 25 °C, por 7 dias, formam colônias 29-35 mm de diâmetro, denso, sulcado, velutino, de centro elevado, tanto flobose ou funiculose, a margem inteira, estreito; micélio branco; conidiogênese abundante, com coloração verde acinzentado ou verde fosco. Capacidade também em crescer no MEA (Ágar Extrato de Malte), a 25 °C, por 7 dias, formando colônias com diâmetros entre 32-40 mm, velutino, margem inteira, estreito; micélio branco; conidiogênese abundante, verde fosco; falta de exsudado; pigmento solúvel pálido ao amarelo pastel (www.bcrc.firdi.org.tw).

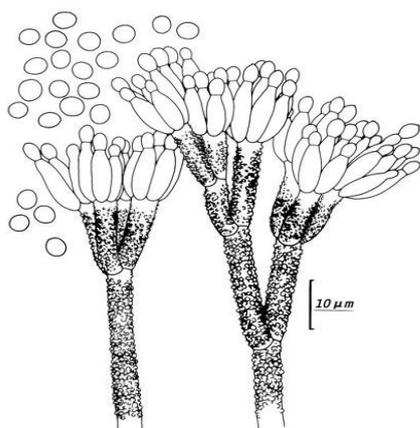


Figura 1. - *Penicillium crustosum*; CCRC 33166, Fiálides. Fonte: www.bcrc.firdi.org.tw

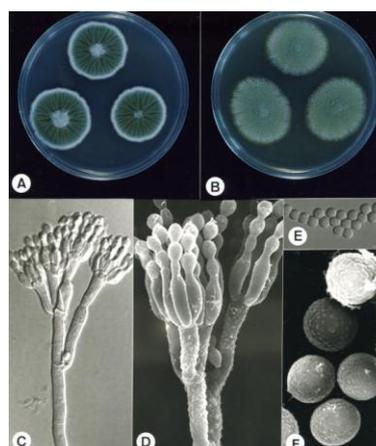


Figura 2. *P. crustosum* (CCRC 33166). A) Crescimento em Meio Czapek Yeast Agar (MYA) e B) Meio Ágar Extrato de Malte (MEA) a 25°C, 7 dias; C) Fiálides (Aumento 1494x); D) Fiálides; (aumento 6125x); E) conídios (aumento 1485x); F) conídios (aumento 5790x). Fonte: <http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi>

2.2. Xilanases

2.2.1 Estrutura da parede celular vegetal e enzimas envolvidas em sua degradação

A parede celular vegetal é constituída um arranjo intrincado de polissacarídeos, proteínas e lignina denominado de estrutura lignocelulósica (Figura 3) e sua completa degradação exige um arsenal enzimático atuando sinergicamente (SIQUEIRA et al., 2010).

A porção polissacarídica total da parede celular vegetal, denominada holocelulose, é composta pela celulose, hemicelulose e pectina. Esses polissacarídeos são utilizados como fonte de carbono e energia para diversos micro-organismos, através da atuação de celulases, xilanases e pectinases, que são as principais enzimas envolvidas em sua degradação (SIQUEIRA et al., 2010).

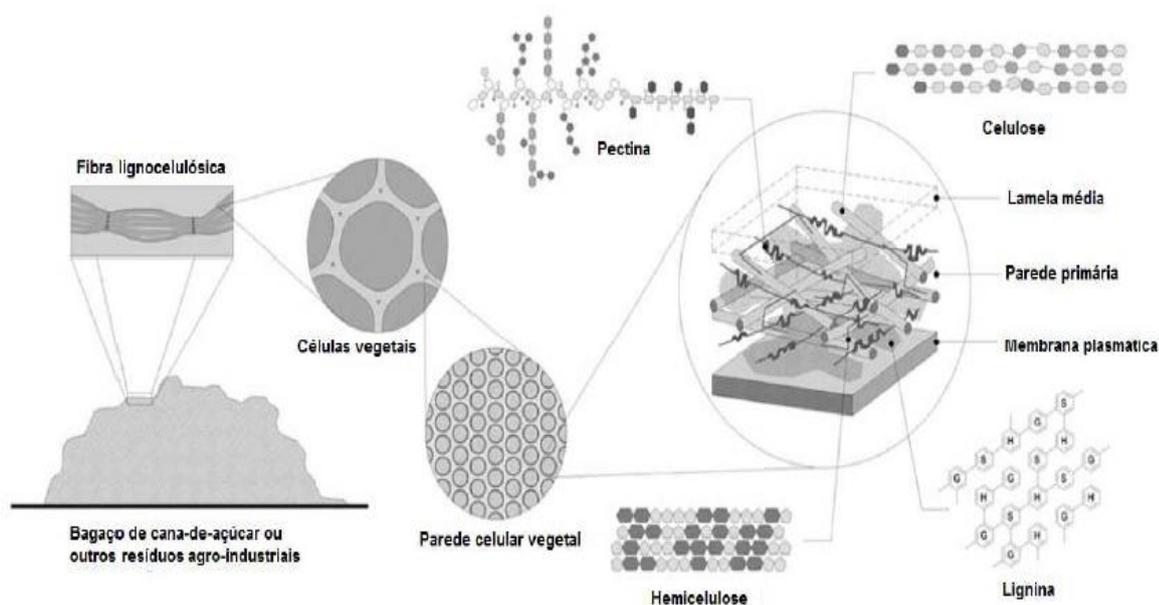


Figura 3. Esquema da estrutura da parede celular vegetal e seus componentes, presente em resíduos agroindustriais. Fonte: SIQUEIRA et al., 2010.

A celulose é um homopolímero linear, sendo o polissacarídeo da parede celular mais abundante, composto por resíduos de D-glicose conectados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Por não ser ramificada contribui para uma forte agregação espontânea de suas cadeias lineares através de interações não covalentes, formando estruturas cristalinas, as microfibrilas. Na estrutura cristalina, os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias impede a penetração de água e enzimas no interior da microfibrila. A celulose cristalina confere rigidez à parede celular vegetal, atribuindo recalcitrância à degradação por micro-organismos. A celulose possui também regiões não cristalinas (amorfos) na estrutura das microfibrilas onde água e enzimas têm maior acesso (LYND et al., 2002; ARANTES e SADDLER, 2010).

As hemiceluloses são formadas por um conjunto heterogêneo de polissacarídeos da parede celular vegetal, as quais fazem parte as xilanas, xiloglucanas, mananas, glicomananas, entre outros (SCHELLER e ULVSKOV, 2010). Além da cooperação entre endo-xilanases e β -xilosidases, o sinergismo entre enzimas de cadeia principal e enzimas acessórias desramificadoras são necessárias para completa desconstrução da xilana (Figura 4). Dentre as enzimas acessórias que removem ramificações da xilana estão as α -

glicuronidasas, α -L-arabinofuranosidase, feruloil e p-cumaroil esterases e acetil xilana esterases. As α -glicuronidasas são enzimas responsáveis pela remoção de resíduos glucurônicos da estrutura da glucuronoxilana. As arabinofuranosidasas (α -L-arabinohidrolase) clivam ligações α -1,3 entre a cadeia de xilose e resíduos L-arabinofuranose das arabinoxilanas (SAHA, 2000). As enzimas feruloil e p-cumaroil esterases hidrolisam as ligações éster na xilana, sendo que a primeira atua nos grupamentos arabinose – ácido ferrúlico e a segunda atua na clivagem entre os grupamentos arabinose – ácido p – coumárico (POLIZELI et al., 2005). As acetilxilanoesterases hidrolisam ligações acetil éster na posição C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose na acetilxilana (SAHO & WIEGEL, 1992).

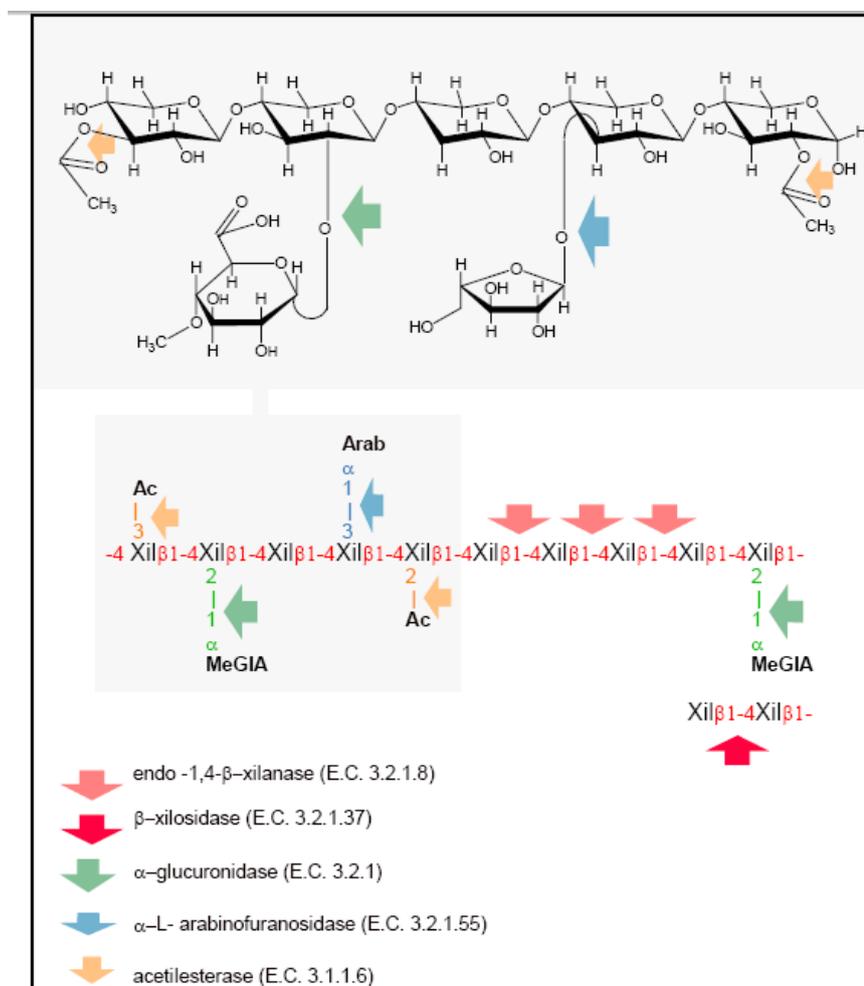


Figura 4. Representação da estrutura da xilana vegetal e os pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil; Arab, L-arabinofuranose ; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico; Xil, D-xilose
Fonte: BIELY, 1985.

A xilana é importante na coesão entre a celulose e a lignina, estando em íntima associação com a celulose e ligada covalentemente à matriz de lignina, revestindo as microfibrilas, atuando na manutenção de sua integridade, além de dificultar a sua degradação pela ação das enzimas celulasas (COLLINS et al., 2005; BEG et al., 2001).

A lignina tem um papel significativo na proteção natural da madeira (DANIEL, 2003). É composta basicamente de unidades fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, representando de 20 a 30% do total de lignocelulósicos (Figura 5). O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e respectiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina, que se processam por via radicalar da reação de três diferentes alcoóis cinamílicos precursores (sinapílico, coniferílico e para - cumarílico). Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligação entre as unidades fenilpropano. As mais abundantes são: β -O-4 e α -O-4 (50 a 65%), β -5 (6 a 15%), β -1 (9 a 15%), 5-5 (2 a 9%) e β - β (2 a 5%). Esses vários tipos de ligações formadas originam uma estrutura tridimensional complexa.

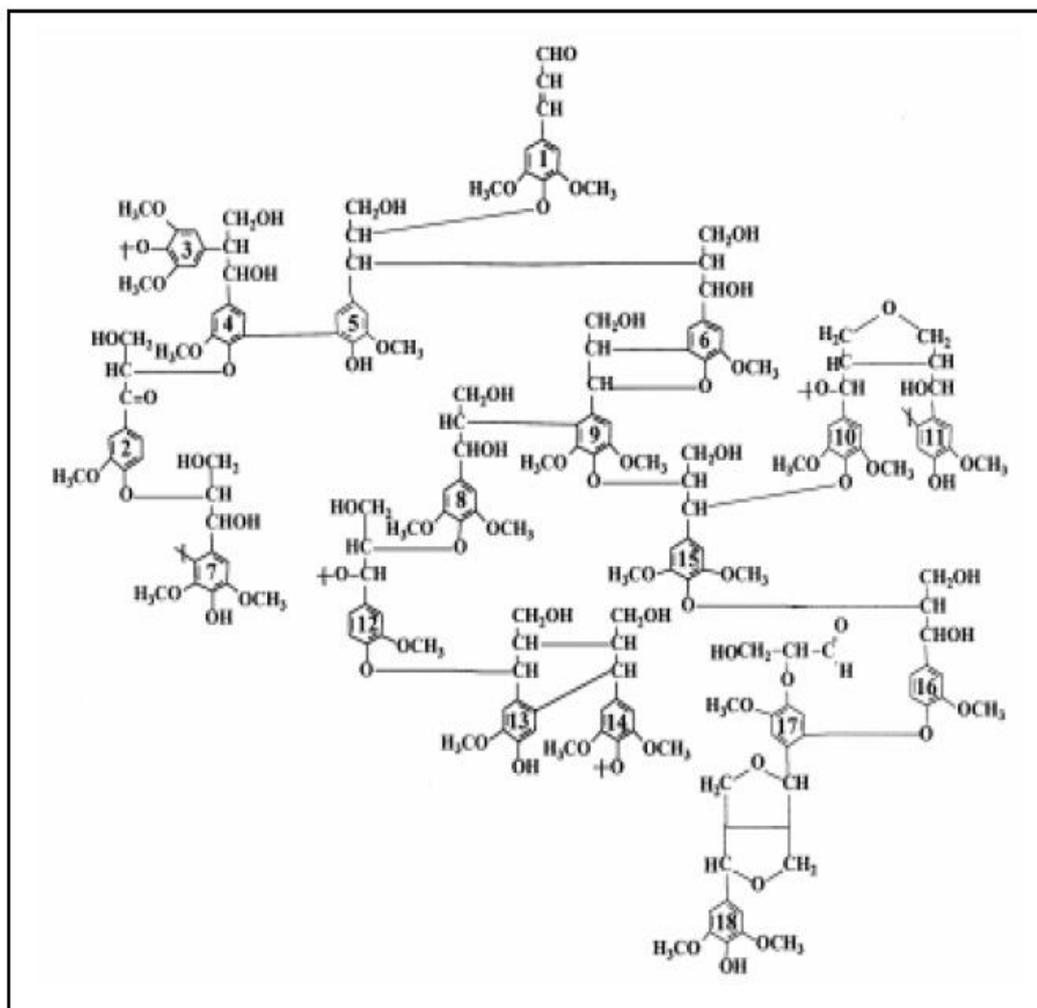


Figura 5. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Eucalyptus grandis*. Fonte: BRASILEIRO et al., 2001.

2.2.2 Composição química e degradação da hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários açúcares (D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos), 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. Esses carboidratos estão ligados entre si, através de ligações glicosídicas β-1,4, formando uma estrutura principal composta, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Portanto, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-

glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, possuem diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY, 1985; DA SILVA et al., 1997).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas sua maior concentração localiza-se nas camadas primária e secundária, que estão intimamente associadas à celulose e lignina. Aproximadamente 40% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se à hemicelulose sendo, depois da celulose, o carboidrato mais abundante na natureza (WOODWARD, 1984; DA SILVA et al., 1997).

2.2.3 Produção de xilanases por micro-organismos

A produção de xilanases por micro-organismos estende-se à utilização, principalmente, de bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras. As xilanases apresentam características diferentes, como pH e temperatura ótimos de atuação, e especificidade pelo substrato, dependendo do micro-organismo produtor (HALTRICH et al., 1996). De uma forma geral, as xilanases de origem microbiana possuem uma composição proteica simples e massa molecular entre 8 e 145 kDa. A faixa ótima de temperatura para produção de endo-xilanases, por bactérias ou fungos, varia de 40 a 60°C, sendo as bactérias mais conhecidas por produzirem xilanases termoestáveis (KULKARNI et al., 1999). Geralmente os fungos filamentosos são micro-organismos naturalmente mesófilos, mas há trabalhos indicando a produção de xilanases termoestáveis por algumas espécies, como *Thermoascus aurantiacus* e *Melanocarpus albomyces* relatados por KALOGERIS et al. (1998) e JAIN et al. (1998), respectivamente. As xilanases, provenientes de diferentes micro-organismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo, no entanto, a melhor produção enzimática obtida em pH entre pH 4 e 7.

Os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo, que sob o ponto de vista industrial, são particularmente interessantes. Além disto, os fungos

possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também, as suas ramificações (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999).

Um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanases, por micro-organismos, refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, bem como analisar a produção de celulases, pois, 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 micro-organismo (KULKARNI et al., 1999).

Em geral, o mecanismo que regula a indução das xilanases é complexo e a resposta, em termos de produção enzimática, frente a um indutor, varia para cada micro-organismo, pois um indutor que leva a máxima produção em uma espécie pode ser repressor em outro organismo (KULKARNI et al., 1999). Biely (1985) propôs um mecanismo de indução de xilanase para a levedura *Cryptococcus albidus* no qual uma pequena quantidade de xilanase constitutiva, suficiente apenas para a indução do sistema, é produzida e excretada no meio, hidrolisando a xilana em compostos de peso molecular menor, capazes, então, de entrar na célula e induzir a produção de xilanase. Xilose e glicose, provenientes da ação da enzima sobre estes xilo-oligômeros, são repressores, funcionando como um controle sobre a produção. Segundo o autor, este sistema pode ser a explicação para a indução de xilanase em outros micro-organismos.

A partir da descrição do mecanismo de indução das endo-xilanases, pode-se concluir que a utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção destas enzimas, 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, como bagaço

de cana de açúcar, palha de milho, e fibras de trigo entre outros, tem sido a solução mais empregada.

A composição dos meios de cultivo para a produção de xilanases por diferentes micro-organismos incluem, algumas vezes, além do substrato indutor, diversos sais minerais e alguns íons metálicos. No entanto, muito frequentemente, é necessário acrescentar aos meios, uma fonte de nitrogênio. Geralmente, obtém-se bons resultados, em termos de produção de xilanase, fazendo uso de extrato de levedura e peptona na composição dos meios (HALTRICH et al., 1996). Entretanto, estes compostos podem ser substituídos, com sucesso, por materiais de custo muito mais baixo, conforme relatado por Lu et al. (2003) que utilizaram farelo de soja e farelo de peixe na produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em escala piloto.

É importante ressaltar que, além dos fatores até aqui descritos, a produção de xilanases, por fungos filamentosos, é influenciada, ainda, por variáveis como temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido e agitação dos meios (HALTRICH et al., 1996).

2.2.4 Aplicações industriais de xilanases

O interesse na produção de xilanases deve-se a sua grande potencialidade de aplicação industrial, em diferentes segmentos que, de acordo com Biely (1995) divide-se em duas categorias sendo uma livre de celulasas e a outra, com uso associado de outras polissacaridasas.

A xilose produzida pela ação das xilanases pode ser convertida a etanol e xilitol através de fermentação por micro-organismos selvagens ou geneticamente modificados. O xilitol é um poliálcool que apresenta poder adoçante semelhante à sacarose, baixo teor calórico e não cariogênico, podendo ser usado como adoçante de baixa caloria nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como citado por Polizeli et al (2005).

As xilanases também podem ser utilizadas como aditivos em ração de animais monogástricos com o objetivo de aumentar a digestibilidade dos seus ingredientes. O uso dessas enzimas em ração pode diminuir a viscosidade da

ração no trato digestivo do animal, melhorando a motilidade do bolo alimentar, a digestão e a absorção dos nutrientes, exigindo um menor gasto de energia pelo animal e melhorando o ganho de peso (POLIZELI et al., 2005; MOTTA et al., 2013). Além disso, xilooligossacarídeos produzidos por xilanases podem atuar como pré-biótico, estimulando o crescimento ou atividade de microorganismos no trato digestivo e conferindo benefícios à saúde do animal (LAFOND et al., 2011).

As xilanases, em ação conjunta com amilases, também podem ser utilizadas para melhorar a qualidade de pães. A hidrólise da hemicelulose e do amido da farinha permite um crescimento maior da massa e uma maior retenção de água, retardando o ressecamento do pão (POLIZELI et al., 2005; MOTTA et al., 2013; MONFORT et al., 1996).

As xilanases podem também ser usadas, em conjunto com pectinases, celulases e amilases, na extração de suco de frutas e na clarificação e redução da viscosidade de sucos, vinhos e cervejas. A hidrólise enzimática dos polissacarídeos da parede celular que ficam em suspensão pode contribuir para a diminuição do aspecto turvo e viscoso por eles conferidos (POLIZELI et al., 2005; MOTTA et al., 2013).

Por fim, outra aplicação industrial das xilanases tem sido no pré-branqueamento de polpa de celulose e papel.

2.2.5 Branqueamento enzimático

Durante a última década, o potencial de aplicação biotecnológico da xilana e enzimas xilanolíticas tem sido de interesse particular para muitos pesquisadores. As xilanases ganharam importância devida à sua aplicação no pré-branqueamento de polpa Kraft, substituindo compostos químicos contendo cloro. Tais enzimas têm um papel importante na reciclagem de fibras e na purificação da celulose para a preparação da polpa dissolvida.

Viikari et al (1986) foram os primeiros a demonstrar que o tratamento de polpa com hemicelulases que pode substituir subsequentemente a

necessidade de cloro para o branqueamento da polpa. O branqueamento consiste na remoção da lignina presente na polpa retirada da madeira, assim o uso de xilanases pode ajudar neste processo.

Segundo Bajpai (2004), o processo kraft possui o melhor custo benefício para o processo de polpação. Porém, uma desvantagem é a cor da polpa, que torna-se marrom escura durante o processo de cozimento devido às modificações que ocorrem na lignina residual das fibras. Tal processo visa à remoção de grande parte da lignina e das hemiceluloses através do cozimento de cavacos de madeira com solução de hidróxido de sódio e sulfito de sódio sob alta pressão e temperatura. Estes dois reagentes atuam na deslignificação da polpa, gerando um licor escuro rico em lignina e hemiceluloses. A polpa de celulose resultante é escura e, apesar de já ter boa parte da lignina e hemicelulose removidas, apresenta cadeias curtas de hemicelulose e restos de lignina depositados sobre as fibras de celulose, que precisa, portanto, passar por um processo posterior de branqueamento.

Usualmente empregam-se diversas etapas com o intuito da remoção da lignina residual utilizando oxigênio, ozônio, peróxido de hidrogênio, hidróxido de sódio, gás cloro ou dióxido de cloro (DURAN et al., 2008). Ao final do processo de branqueamento tem-se a chamada polpa branca de celulose. O dióxido de cloro e gás cloro promovem a solubilização da lignina residual, facilitando sua remoção (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). O emprego do cloro produz substâncias organocloradas extremamente tóxicas, mutagênicas e resistentes à biodegradação, necessitando que ocorra o tratamento dos efluentes gerados no processo antes do descarte para o meio ambiente.

As principais variáveis em cada estágio de branqueamento são: dosagens de reagentes, consistência, pH da reação e pressão de ação (estágio em fase gasosa), sendo principais parâmetros de controle de qualidade: Número Kappa, que determina a quantidade de lignina residual nas paredes celulares das fibras que compõem a polpa celulósica; viscosidade, que é uma variável usada para medir o grau de degradação das fibras na polpa celulósica, pois quanto mais degradadas as fibras na polpa celulósica, menor a viscosidade; alvura, onde se avalia a brancura e eficiência do branqueamento

da polpa celulósica, sendo que, quanto maior for a alvura da polpa celulósica, menores quantidades de alvejantes ópticos serão usadas na fabricação do papel proveniente de uma sequência de branqueamento de celulose em processo convencional.

Estágios do processo de branqueamento de celulose para a produção de papel: a) Estágio Z/D: utiliza ozônio e dióxido de cloro; b) Estágio Eop: utiliza hidróxido de sódio, oxigênio e peróxido de hidrogênio; c) Estágio D: utiliza dióxido de cloro (Figura 6).

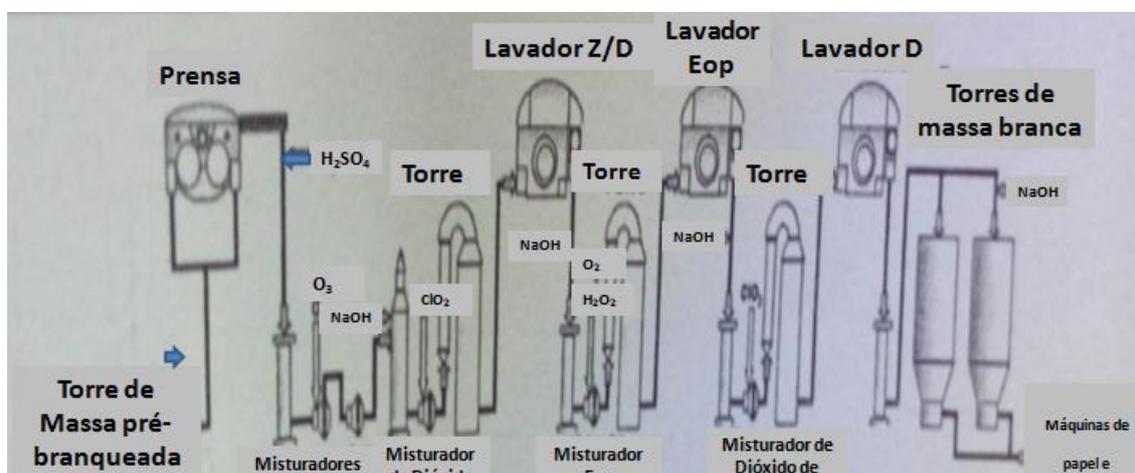


Figura 6. Fluxograma do processo convencional de branqueamento de celulose. Adaptado do treinamento operacional da Votorantim celulose e papel, 2001.

A aplicação de xilanases antes do branqueamento pode otimizar este processo, reduzindo custos, o emprego de reagentes clorados e da produção de compostos tóxicos, e ainda facilitar a remoção da lignina nas etapas subsequentes. Nos processos que são livres de reagentes clorados, as xilanases aumentam o brilho e a força do papel, e também diminuem a quantidade de reagentes necessários (BUCHERT et al., 1994; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; DURAN et al., 2008).

O mecanismo pelo qual as xilanases facilitam o branqueamento não é completamente compreendido (FILHO, 1998; RONCERO et al., 2003). As hipóteses mais conhecidas afirmam que as enzimas aumentam a exposição das fibras de celulose. A hidrólise da xilana que encontra-se depositada sobre as fibras de celulose as tornariam mais permeáveis ao reagentes empregados

no branqueamento, facilitando a extração da lignina residual, e considerando que existem ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina na polpa kraft, a clivagem da xilana (mais facilmente degradada que lignina) permite maior liberação de lignina residual (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; POLIZELI et al., 2005; DURAN et al., 2008).

O uso de outras hemicelulases como mananases, galactosidases e feruloil esterases e ligninases, também auxiliam no branqueamento da polpa de celulose e atuam em sinergia com as xilanases (SIGOILLOT et al., 2005).

O principal objetivo do biobranqueamento é obter maior alvura e grau de brancura da pasta (previamente deslignificada com oxigênio) que é própria para a fabricação de papéis brancos, através da remoção de substâncias que absorvem luz (grupos cromóforos), buscando minimizar o prejuízo químico e mecânico da fibra, a formação de grupos carbonila, a perda de rendimento, o custo e o impacto no meio ambiente, pois prevê a redução do uso de dióxido de cloro.

3. REFERÊNCIAS

- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.
- BAJPAI, P. Biological Bleaching of Chemical Pulps. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 1-58, 2004.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOODAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p: 326–338, 2001.
- BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, 3: 286–295, 1985.
- BRASILEIRO, L.B.; COLODETTE, J. L.; PILÓ-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. **Quim. Nova**. V. 24, n. 6, p. 819-829, 2001.
- BUCHERT, J.; TENKANEN, M.; KANTELINEN, A.; VIIKARI, L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. **Bioresource Technology**, v.50, p. 65 - 72,1994.

CHALFOUN, S. M. & BATISTA L. R. Fungos associados a frutos e grãos do café, *Aspergillus & Penicillum*, 2003.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3–23, 2005.

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.

DANIEL, G. Microview of under degradation by bacteria and fungi. In: Wood deterioration and preservation: advances in our changing world. **ACS Symposium Series**. v. 845, p. 34-72, 2003.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.(Eds). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, p. 205 – 239, 2008.

FILHO, E.X.F. Recent Research Developments in Microbiology. PANDALAI, S.G.(ed). India, **Research Signpost**, 1998.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B. KULBE, K.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1-5 million species estimated revisited. **Mycol Res**, v. 105 (12), p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.)**. CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 616. 1995.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **J Biosc Bioeng**, v. 94, No. 6, p. 530-535. 2002.

JAIN, A.; GARG, S.K ; JOHRI, B.N. Properties of a Thermostable Xylanase Produced by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in Solid State Fermentation. **Bioresource Technology**, v. 64: 225 – 228, 1998.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Studies on solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*. Characterization of two isozymes. **J Biotechnol**, v. 60, p. 155–163, 1998.

KIMATI, H. Fungos. In: GALLI, F., TOKESHI, H., CARVALHO, P. C. T., BALMER, T. L., CARDOSO, C. O. N., SALGADO, C. L., KUGNER, T. L., CARDOSO, E. J. V. B., BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. Editora Agrônômica Ceres, 2 ed. São Paulo, 1978.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems** . v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 20, 2011.

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

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 507-77, 2002.

MONFORT, A.; BLASCO, A.; PRIETO, J.A.; SANZ, P. combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae* α -amylase in industrial baker's yeasts and their use in bread making. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3712–3715, 1996.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. (Eds). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization: **InTech**, cap. 10, 2013.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Review. Biotechnol Adv.** v.22, p. 189-259, 2004.

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

RONCERO, M. B.; TORRES, A.L.; COLOM, J. F.; VIDAL, T. TCF bleaching of wheat straw pulp using o-zone and xylanase. Part A: paper quality assessment. **Bioresour. Technol.**, 87 (3): 305-14, 2003.

SAHA, B. α -1-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnol. Advances**. 18: 403-423, 2000.

SAHO, W & WIEGEL, J. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **J. Bacteriol.** 174 (18): 5848-5853, 1992.

SCHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SIGOILLOT, C.; CAMARERO, S.; VIDAL, T.; RECORDA, E.; ASTHER, M.; PÉREZ-BOADA, MATÍNEZ, M.J.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; COLOM, J. F.; MARTÍNEZ, A.T. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. **Journal of Biotechnology**, 115, p. 333-343, 2005.

SIQUEIRA, F. G.; SIQUEIRA, E.G.; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.;[ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FILHO, E.X.F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulases from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

TREVISAN, H.C. Lipases. In: SAID, S. & PIETRO, R.C.L.R. Enzimas como agente Biotecnológico. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 115-135, 2004.

VIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Bleaching with enzymes. Proceedings of the 3^o International Conference on Biotechnology for the Pulp and Paper Industry, p. 67- 9, 1986.

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

Site: www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802270016> acesso em 12/10/2014

ARTIGO CIENTÍFICO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE DE *Penicillium crustosum* POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO NO BIOBRANQUEAMENTO DA POLPA CELULÓSICA

Nyéssia Fernanda de S. Silva e Marina K. Kadowaki

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de xilanase pelo *Penicillium crustosum* utilizando o Delineamento Plackett-Burman (DPB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), e sua aplicação no processo de branqueamento da polpa de celulose. A seleção dos componentes de meio de cultivo: NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl ; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, extrato de levedura, palha de milho e pH inicial foi realizada utilizando DPB-12 em condições de cultivo líquido estacionário a 28°C por 6 dias. As variáveis palha de milho, KH_2PO_4 , e pH apresentaram efeitos significativos em $p < 0,10$ por DPB. A análise estatística dos resultados obtidos com DCCR exibiram as três variáveis (KH_2PO_4 0,15 %, palha de milho 2% e pH inicial 6,0) que mostraram efeitos significativos em $p < 0,05$, e a produção máxima de xilanase foi de 50 U/mL, 14 vezes superior em comparação à atividade enzimática antes da otimização. O tratamento da polpa celulósica com a xilanase de *P. crustosum* mostrou uma redução significativa do número kappa em 5,27 pontos e eficiência Kappa de 35,04%. Dessa forma, evidencia-se o potencial de aplicação da xilanase produzida por *P. crustosum* no processo de branqueamento da polpa kraft de Eucaliptos para indústria de papel e celulose.

Palavras-chave: fungos filamentosos, resíduos agrícolas, Planejamento experimental

OPTIMIZATION OF PRODUCTION XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* FOR EXPERIMENTAL DESIGN AND ITS APPLICATION IN CELLULOSIC PULP BIOBLEACHING

Nyéssia Fernanda de S. Silva e Marina K. Kadowaki

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize the production of xylanase by *Penicillium crustosum* using Plackett-Burman the Design (BDP) and Central Composite Rotational Design (CCRD), and its application in the bleaching process of kraft pulp. The PBD-12 was carried out to screening the significant variables of the compounds of the culture medium: NaNO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KCl ; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, yeast extract, corn stover and initial pH under liquid static culture at 28 °C for 6 days. The variables corn stover, KH_2PO_4 , and pH were significant at $p < 0.10$ by DPB. Statistical analysis of the results obtained with CCRD exhibited the three variables (KH_2PO_4 0.15%, corn stover 2% and initial pH 6.0) that showed significant effects at $p < 0.05$, and the maximum production of xylanase was 50 U/mL, 14 times higher compared to enzyme activity before optimization. The treatment of the kraft pulp with *P. crustosum* xylanase showed a significant reduction in kappa number (5.27 Kappa points and efficiency (35.04%). Thus, there is evidence of the potential application of xylanase produced by *P. crustosum* in the bleaching process of kraft pulp in paper industry.

Keywords: filamentous fungi, agricultural waste, Experimental design

1. INTRODUÇÃO

As xilanases (1,4 - xilanhidrolase - D xilana; EC 3.2.1.x) são enzimas pertencentes ao complexo xilanolítico, e são responsáveis pela clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal do xilano, para produzir xilooligossacarídeos e xilose. O xilano é um heteropolissacarídeo encontrado em madeiras e resíduos agrícolas composto de xilose com ligações β -1,4 na cadeia principal. Nas cadeias laterais do xilano podem ser encontrados ainda arabinose, manose, galactose, glicose e ácido glucurônico e grupos acetil [1].

Para despolimerização desta cadeia xilopiranosídica são necessárias principalmente duas classes de enzimas: endo-xilanases, que são enzimas capazes de decompor a cadeia principal do xilano em xilooligossacarídeos; e as β -xilosidases que degradam os xilooligossacarídeos até os monossacarídeos de xilose. As xilanases são classificadas como glicosil hidrolases (GH) com base em suas seqüências de aminoácidos (<http://www.cazy.org>) e podem pertencer às famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 [2, 3].

Entre as fontes microbianas, produtoras de xilanases, estão os fungos filamentosos que são capazes de secretar para o meio externo níveis elevados dessas enzimas quando comparados às bactérias e leveduras [4]. As xilanases têm sido obtidas a partir de vários fungos, tais como: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Talaromyces*, entre outros [5]. Os fungos do gênero *Penicillium* têm sido estudados de longa data principalmente para produção de antibióticos, além da produção de enzimas de interesse biotecnológico como a xilanase. No entanto, o rendimento da produção de xilanase pelos fungos do gênero *Penicillium* tem sido baixo. Além disso, o uso do xilano como indutor tem alto custo, e conseqüentemente limita a produção de xilanase pelos fungos do gênero *Penicillium* em escala industrial [6, 7]. A produção de enzimas microbianas em escala industrial deve atender alguns quesitos, tais como: capacidade de crescer em substratos de baixo custo; produzir enzimas em curto espaço de tempo e possuir métodos de extração simples.

Dentro desse contexto, existem duas maneiras pelas quais os parâmetros do processo de otimização de cultivos para produção de enzimas podem ser adotados: método clássico e estatístico experimental. O método clássico baseia-se no estudo com variação de um fator e os demais fatores são mantidos fixos. Este método é incapaz de detectar as interações frequentes que ocorrem entre dois ou mais fatores, enquanto que a metodologia de planejamento experimental utiliza técnicas estatísticas para a concepção de experiências além de avaliar os efeitos de fatores e analisar as condições ótimas de fatores para respostas desejáveis. O método de planejamento experimental tem sido utilizado com sucesso por muitos pesquisadores para otimizar as composições do meio de fermentação bem como para produção e caracterização bioquímica da enzima [8, 9].

As xilanases tem aplicação nos diversos setores industriais, tais como: biobranqueamento de celulose na indústria do papel, melhoria da textura e do volume da fatia de pão [10] clareamento de suco e vinho, melhoria do valor nutricional de alimentos armazenados e extração de óleo vegetal, café e amido [11].

O interesse nas enzimas xilanolíticas e sua aplicação na polpa celulósica pelas indústrias de papel têm avançado significativamente nos últimos anos devido à crescente demanda de papel. Assim, métodos alternativos para o branqueamento de celulose tem sido sugeridos [12]. Atualmente, a utilização de xilanases para branqueamento da polpa é reconhecido como um processo baseado em biotecnologia economicamente viável nas indústrias de papel e celulose. O pré-branqueamento com xilanases faz exatamente essa função de reduzir a necessidade de produtos químicos branqueadores tóxicos, e é, portanto, ambientalmente e economicamente vantajoso [13]. Uma metodologia alternativa para a eliminação do cloro em operações de branqueamento, reduz o uso de compostos orgânicos clorados na etapa do processo de branqueamento que conseqüentemente reduz o número kappa (teor de lignina residual na polpa) e aumenta o brilho da pasta [14]. Esta estratégia baseia-se na especificidade única de hemicelulases, particularmente enzimas xilanolíticas, em atacar o componente da hemicelulose na polpa. As endo- β -xilanases atuam na hidrólise do xilano

encontrado em pasta de papel, que posteriormente facilita a remoção do complexo lignina-carboidrato (LCC), gerado no processo kraft, que age como uma barreira física contra a entrada de produtos químicos no branqueamento. A remoção desse LCC, portanto, facilita a extração eficiente de lignina da polpa[15]. As xilanases, para atuarem no biobranqueamento, devem apresentar quesitos como: livres de atividade de celulase, estabilidade térmica, tolerância à condição alcalina, estabilidade no processo de polpação kraft, além de evitar danos para a pasta de celulose.

Dentre as xilanases de fungos filamentosos mais estudados para o biobranqueamento da polpa celulósica, encontra-se o gênero *Aspergillus*. O gênero *Penicillium* ainda é pouco explorado para biobranqueamento da polpa celulósica, porém algumas espécies como o *P. corylophilum* [14] e *P. janczewskii* [16] tem sido estudadas. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar os componentes do meio de cultivo visando aumento da produção de xilanase extracelular do *Penicillium crustosum* através de planejamentos estatísticos de Delineamento Plackett - Burman e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e verificar seu potencial de aplicação no biobranqueamento da polpa celulósica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

O fungo *P. crustosum* foi obtido de uma coleta realizada no Refúgio Biológico Bela Vista em Foz do Iguaçu-Paraná, Brasil, conforme metodologia padronizada pelo projeto de rede SISBIOTA – BRASIL, e armazenado na Coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O fungo foi mantido em tubos inclinados contendo 5 mL de meio sólido Agar – batata – dextrose (BDA), crescido a 28 °C em estufas de incubação tipo BOD por 10 dias, e posteriormente estocados em geladeira a 4 °C por até 30 dias.

2.2 Identificação taxonômica do micro-organismo

A extração de DNA genômico do fungo foi realizada utilizando a metodologia descrita por White et al. [17]. O fragmento de DNA da região ITS foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverso). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% e revelados com brometo de etídio. A purificação dos produtos de PCR e a determinação das seqüências utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram realizadas pela empresa Helixxa® (Campinas-SP, Brasil). A seqüência de 543 pb mostrou 100% de identidade com outras linhagens de *Penicillium crustosum* quando comparada com as seqüências depositadas no banco de dados de domínio público (Genbank) utilizando o algoritmo BLAST. Esta seqüência encontra-se depositada e disponível com acesso KM065878 no NCBI.

2.3 Influência de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase por *P. crustosum* em cultivo líquido estacionário

A produção de xilanase pelo fungo *P. crustosum*, foi testada na presença de diferentes resíduos agrícolas, tais como palha de milho, fibra de trigo, palha de trigo, sorgo panícula e sorgo biomassa, em meio líquido Czapek na concentração de 1% (p/v) em frascos erlenmeyer de 250 mL. Os esporos dos fungos foram inoculados (1×10^5 esporos/mL) e incubados a 28 °C por 6 dias, em estufas de incubação tipo BOD. Posteriormente, os cultivos foram filtrados com funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº 1 com auxílio de bomba de vácuo. O filtrado obtido foi utilizado como fonte de extrato bruto de xilanase.

2.4 Condições de cultivo do fungo

O meio líquido utilizado para a produção de xilanase foi composto por NaNO₃; KH₂PO₄; MgSO₄.7H₂O; KCl; Fe₂(SO₄)₃, extrato de levedura e palha de milho (fonte de carbono) e pH que variou de 6,0 a 8,0. As concentrações de cada componente do meio de cultivo tiveram seus valores ajustados conforme consta no planejamento experimental. Os cultivos submersos foram preparados

conforme o delineamento experimental. Posteriormente, seguiu o procedimento do item 2.3 até a obtenção do extrato bruto enzimático.

2.5 Seleção de componentes do meio de cultivo de *P. crustosum* através do Delineamento Plackett - Burman (DPB)

Oito variáveis independentes foram estudadas em 16 experimentos, incluindo NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, KCl, Fe₂(SO₄)₃· 7H₂O, extrato de levedura, palha de milho e pH, cada variável foi representada em dois níveis, indicados por (+1) e (-1). Quatro repetições nos pontos centrais (0) foram adicionados para verificar a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados foram analisados através do software Statistica versão 10.0 e as variáveis, que apresentaram p<0,1 no gráfico de Pareto foram consideradas ideais, por influenciarem de forma significativa a produção de xilanase.

2.6 Otimização da produção de xilanase por *P. crustosum* utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional e Metodologia de Superfície de Resposta foram empregados para otimizar a produção de xilanase, a partir de fatores previamente selecionados por planejamento Plackett-Burman. Assim, a matriz de DCCR (2³) foi construída utilizando as variáveis KH₂PO₄, palha de milho e pH, incluindo quatro repetições nos pontos centrais e seis pontos axiais (Tabela 1).

Tabela 1. Valores codificados e reais das variáveis do DCCR

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Palha de milho (%)	1,16	1,5	2	2,5	2,84
KH ₂ PO ₄ (%)	0,07	0,1	0,15	0,2	0,23
pH	5	5,4	6	6,6	7

A resposta para as variáveis, em que Y significa a atividade da xilanase, e pode ser aproximada por uma equação de polinômio (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde β_0 é o intercepto; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes de primeira ordem do modelo; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação; e β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes de segunda ordem do modelo. O teste t-Student's foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão, e para analisar os dados experimentais foi utilizado o Software Statistica 10.0.

2.7 Determinação da atividade de xilanase

A atividade de xilanase extracelular foi determinada através da liberação de açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com xilano 1% tamponado, utilizando-se o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como descrito por Miller [18]. A reação foi constituída de 500 μ L de xilano 1% em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, e 500 μ L do filtrado contendo a enzima xilanase (diluída se necessário). Após a incubação da mistura de reação a 50°C, alíquotas de 125 μ L foram retiradas em determinados tempos e adicionadas em tubos contendo 125 μ L de DNS, em seguida os tubos foram aquecidos em banho fervente por 5 min e, foram adicionados 1 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540nm contra um branco (xilano 1% tamponado, água e DNS, nas mesmas condições). A quantificação de açúcares redutores nas alíquotas foi estimada de acordo com a curva padrão de xilose. A unidade de atividade xilanolítica foi definida como sendo a quantidade de xilose produzida por mL de enzima por minuto, nas condições de ensaio (U/mL). Todas as dosagens enzimáticas foram realizadas em triplicata.

2.8 Determinação do pH e estabilidade ao pH da xilanase produzida pelo fungo *P. crustosum*

O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi determinada através da incubação da enzima em tampão McIlvaine, cujo pH variou entre 2,5 a 8,0. A atividade residual foi determinada utilizando o ensaio padrão.

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação da enzima pré-incubada (em banho de gelo) em tampão McIlvaine sem substrato, durante 108 horas nos pHs 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 retirando-se alíquotas em diferentes tempos para a determinação da atividade xilanásica residual.

2.9 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade da xilanase do fungo *P. crustosum*.

Para determinar a temperatura ótima da xilanase, o ensaio foi conduzido a várias temperaturas de incubação que variaram de 35 °C a 60°C.

A estabilidade térmica foi conduzida por incubação da enzima sem substrato, em banho-maria, nas temperaturas 40, 50 e 60 °C por até 180 minutos. A cada intervalo, alíquotas da amostra incubada foram retiradas para determinação da atividade xilanásica residual.

2.10 Tratamento da polpa celulósica com a xilanase de *P. crustosum*

2.10.1 Obtenção da polpa celulósica

A polpa kraft de eucalipto pré-tratada com oxigênio foi gentilmente cedida pela Indústria de Papel e Celulose Klabin, localizada na cidade de Telêmaco Borba, PR. A massa úmida (m.u.) da polpa kraft foi pesada e desidratada em estufa de secagem a 45 °C por 12 horas, para obtenção da polpa seca (m.s.). Em seguida a consistência foi determinada pela relação massa seca/massa úmida, sendo expressa em porcentagem.

2.10.2 Tratamento enzimático da polpa kraft

A xilanase presente no filtrado de *P. crustosum* foi adicionada à polpa Kraft na concentração de 25 U/g de polpa absolutamente seca. Em seguida, tampão McIlvaine pH 6,5 foram adicionados, a fim de que as polpas atingissem uma consistência final de 5%. Como controle, água destilada foi adicionada em substituição à enzima. As misturas de enzima e polpa foram inseridas em sacos de polietileno (tipo Zip Lock) e mantidas em banho-maria a 50°C por 120 min. Decorrido o tempo de tratamento, a polpa foi filtrada e centrifugada a 2000 x g por 10 min. O filtrado obtido foi submetido a análise do cromóforo, quantificado em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 237 nm e 465 nm. e a quantidade de açúcares redutores determinado pelo método de Miller (1959), utilizando-se a D-xilose como padrão.

2.10.3 Determinação do número Kappa na polpa

O número Kappa (teor de lignina residual) foi determinado pela oxidação por permanganato de potássio através da titulação com tiosulfato de sódio, seguindo-se a metodologia de TAPPI, 1985 [19]. O cálculo do número Kappa foi determinado pelas equações 2, 3 e 4 (TAPPI, 1985).

$$P = \frac{(b-a).N}{0,1} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$f = 0,0084 \cdot P + 0,895 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$K = \frac{P \cdot f}{W} \cdot [1 + 0,013 \cdot (25 - T)] \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

P= volume de KMnO_4 que reagiu (mL).

a= volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pela amostra (mL).

b= volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pelo branco (mL).

f= fator de correção determinado para cada P. (TAPPI, 1985)

N= normalidade real da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (padronizada)

T= temperatura da análise ($^{\circ}\text{C}$).

W= massa da polpa seca (g).

K= número kappa.

2.10.4 Determinação da viscosidade

Para a determinação de viscosidade da polpa foi utilizada a metodologia do TAPPI (1982) [20] com auxílio de um viscosímetro tipo Ostwald-Fensk, em forma de U. A medida foi efetuada em triplicata. A constante de viscosímetro foi calculada segundo a equação 5:

$$K = \frac{V}{t.d} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

K = constante do viscosímetro ($\text{cPs}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$)

V = viscosidade do H_2SO_4 98% = 19,25 cP (TAPPI, 1982)

d = densidade do H_2SO_4 98% = 1,84 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (WEAST, 1984)

t = tempo de escoamento (s)

E a viscosidade das soluções foi determinada pela equação 6:

$$V = K.t.d \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

V = viscosidade da solução de polpa (cP)

K = Constante do viscosímetro ($\text{cPs}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$)

t = tempo de escoamento (s)

d = densidade da solução de celulose = $1,052 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (TAPPI, 1982)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A palha de milho utilizada como fonte de carbono foi selecionada previamente em estudo anterior. Este substrato é um material abundante no Brasil, considerada resíduo agrícola que geralmente é incinerado, ou seja, pouco aproveitado de forma a gerar renda. Portanto, este resíduo composto de alta concentração de hemicelulose (58%) e celulose (41%) induziu a produção da xilanase deste fungo. A utilização de resíduos agrícolas como fontes de carbono alternativas pode reduzir os custos de produção de enzimas para a produção em escala industrial [21].

3.1 Seleção dos componentes do meio de cultivo para produção de xilanase do *P. crustosum* utilizando Delineamento Plackett - Burman (DPB)

Neste estudo foi utilizada estratégia estatística em duas etapas, combinando o Delineamento Plackett - Burman seguido de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com análise de superfície de resposta. Primeiramente, a pré-seleção dos componentes do meio Czapek (NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e extrato de levedura) pH inicial, e palha de milho foi realizada através de DPB com doze ensaios e quatro repetições no ponto central. Pode-se observar que a produção de xilanase do *P. crustosum* mostrou grandes variações (Tabela 2). A produção máxima de xilanase ocorreu no ensaio 7 (40 U/mL) e a mais baixa produção no ensaio 8 (6 U/mL). As variáveis KH_2PO_4 , palha de milho e o pH do meio de cultivo foram variáveis independentes que mais influenciaram a produção de xilanase de *P. crustosum* nesta etapa (Figura 1). As variáveis que não influenciaram

significativamente na produção de xilanase foram então fixadas nas concentrações (NaNO_3 0,15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%, KCl 0,025, extrato de levedura 0,15%) para a etapa de DCCR.

Tabela 2. Matriz do Delineamento Plackett – Burman (DPB-12) para a seleção de fatores que afetam a produção de xilanase produzida por *P. crustosum*

Ensaio	X1		X2		X3		X4		X5		X6		X7		X8		Atividade Enzimática (U/mL)
	NaNO_3		KH_2PO_4		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		KCl		$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$		Ext. Levedura		Palha de Milho		pH		
1	1	(0,3g)	-1	0	1	(0,05g)	-1	0	-1	0	-1	(0,05g)	1	(0,375g)	1	8	26,40
2	1	(0,3g)	1	(0,1g)	-1	0	1	(0,05g)	-1	0	-1	(0,05g)	-1	(0,125g)	1	8	7,98
3	-1	0	1	(0,1g)	1	(0,05g)	-1	0	1	(0,001g)	-1	(0,05g)	-1	(0,125g)	-1	6	25,60
4	1	(0,3g)	-1	0	1	(0,05g)	1	(0,05g)	-1	0	1	(0,15g)	-1	(0,125g)	-1	6	11,60
5	1	(0,3g)	1	(0,1g)	-1	0	1	(0,05g)	1	(0,001g)	-1	(0,05g)	1	(0,375g)	-1	6	26,80
6	1	(0,3g)	1	(0,1g)	1	(0,05g)	-1	0	-1	(0,001g)	1	(0,15g)	-1	(0,125g)	1	8	15,20
7	-1	0	1	(0,1g)	1	(0,05g)	1	(0,5g)	1	0	1	(0,15g)	1	(0,375g)	-1	6	40,00
8	-1	0	-1	0	1	(0,05g)	1	(0,5g)	1	(0,001g)	-1	(0,05g)	1	(0,375g)	1	8	6,00
9	-1	0	-1	0	-1	0	1	(0,5g)	-1	(0,001g)	1	(0,15g)	-1	(0,125g)	1	8	11,60
10	1	(0,3g)	-1	0	-1	0	-1	0	1	(0,001g)	1	(0,15g)	1	(0,375g)	-1	6	34,40
11	-1	0	1	(0,1g)	-1	0	-1	0	1	0	1	(0,15g)	1	(0,375g)	1	8	27,20
12	-1	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	0	-1	(0,05g)	-1	(0,125g)	-1	6	10,00
13	0	(0,15g)	0	(0,05g)	0	(0,025g)	0	(0,025g)	0	(0,0005g)	0	(0,1g)	0	(0,250g)	0	7	26,80
14	0	(0,15g)	0	(0,05g)	0	(0,025g)	0	(0,025g)	0	(0,0005g)	0	(0,1g)	0	(0,250g)	0	7	20,80
15	0	(0,15g)	0	(0,05g)	0	(0,025g)	0	(0,025g)	0	(0,0005g)	0	(0,1g)	0	(0,250g)	0	7	22,00
16	0	(0,15g)	0	(0,05g)	0	(0,025g)	0	(0,025g)	0	(0,0005g)	0	(0,1g)	0	(0,250g)	0	7	20,40

Valores codificados: (-1) (0) (+1) e suas respectivas concentrações (p/v); quatro pontos centrais.

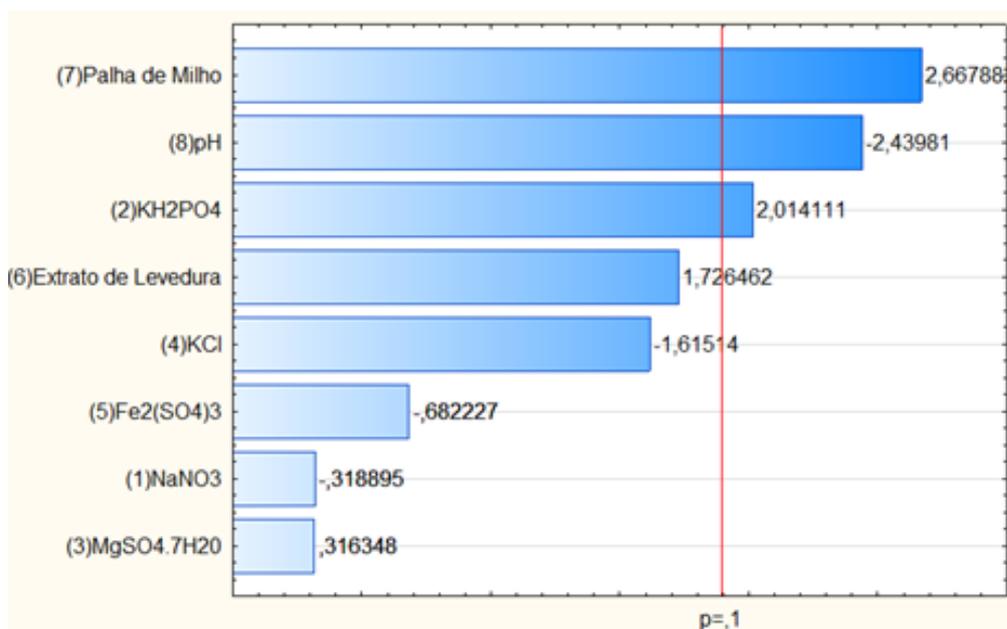


Figura 1. Variáveis significativas no Delineamento Plackett-Burman - Diagrama de Pareto

3.2 Otimização da produção de xilanase do *P. crustosum* através de DCCR e Análise de Superfície de Resposta

O estudo utilizando a combinação do DPB e DCCR, permitiram encontrar as principais variáveis independentes do meio de cultivo para otimização de cultivo, bem como as interações dessas variáveis na produção de xilanase por *P. crustosum*. Os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 15 a 18, compostos de (0,15 % KH_2PO_4 , 2% de palha de milho e, pH inicial 6,0). Por outro lado, os ensaios 2 e 5 mostraram as mais baixas atividades xilanásicas (8 a 9,4 U/mL) cuja as concentrações das variáveis foram palha de milho 2,5% e pH inicial de 6,6 (Tabela 3).

Tabela 3. Planejamento experimental para otimização da produção de xilanase por *P. crustosum* utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	Variáveis			Ativ. Enzimática U/mL
	X ₁ Palha de Milho	X ₂ KH ₂ PO ₄	X ₃ pH	
1	-1	-1	-1	12
2	1	-1	-1	9,4
3	-1	1	-1	12,8
4	1	1	-1	21,6
5	-1	-1	1	8
6	1	-1	1	22
7	-1	1	1	13,2
8	1	1	1	28
9	-1,68	0	0	12,8
10	1,68	0	0	24,4
11	0	-1,68	0	21,6
12	0	1,68	0	19,6
13	0	0	-1,68	24,4
14	0	0	1,68	21,6
15	0	0	0	50,8
16	0	0	0	46
17	0	0	0	47
18	0	0	0	48,4

DCCR (2^3): 6 pontos axiais; 4 pontos centrais.

A equação de regressão obtida após análise de variância (ANOVA), considerando as variáveis significativas ($p < 0,05$), que resulta no modelo codificado reduzido da atividade enzimática de xilanase em função de KH_2PO_4 (linear e quadrático), palha de milho (linear e quadrático) e pH inicial (linear e quadrático) (equação 7).

$$Y \text{ (U ml}^{-1}\text{)} = 48,20 + 3,99X_1 - 11,11 X_1^2 + 1,53X_2 - 10,41 X_2^2 + 0,78X_3 - 9,56X_3^2$$

(Eq. 7)

Onde Y: valores preditos da atividade enzimática xilanase (U/mL); X_1 : valores codificados da palha de milho; X_2 : valores codificados da concentração de KH_2PO_4 e X_3 : valores codificados do pH. Os resultados da ANOVA para o modelo reduzido de segunda ordem foram estabelecidos e observou-se que o modelo apresentou regressão significativa Fcal foi 12,09 vezes maior que o Ftab e falta de ajuste não significativa (Tabela 4); O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9532, este valor indica que o modelo explicou 95,32% da variação dos dados experimentais, portanto considerado um bom modelo estatístico.

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA) para os parâmetros de metodologia de superfície e resposta para o modelo reduzido de segunda ordem

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcal	Ftab	R^2
Regressão	4334,97	6	722,49	37,38	3,09	95,32
Resíduo	212,62	11	19,33			
Falta de ajuste	199,63	8	24,95	5,76	8,85	
Erro Puro	12,99	3	4,33			
Total	4547,59	17				

SQ: Soma dos Quadrados; GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fcal: Fcalculado; Ftab: Ftabelado; R^2 : Coeficiente de determinação.

As superfícies de respostas de xilanase obtida a partir do modelo de segunda ordem e as melhores condições para produzir xilanase estão representadas na Figura 2. Nos resultados obtidos por DCCR, os pontos centrais apresentaram maiores valores de produção de xilanase do *P. crustosum* (Tabela 2). Após a otimização do cultivo, houve um aumento considerável e significativo de 14 vezes na produção de enzima (50 U/mL) quando comparado antes da otimização, que era 3,5 U/mL. Os resultados revelam que as concentrações das variáveis independentes, palha de milho

(0,15%), KH_2PO_4 (2%) e pH inicial (6,0) foram as melhores condições para produzir xilanase por este fungo.

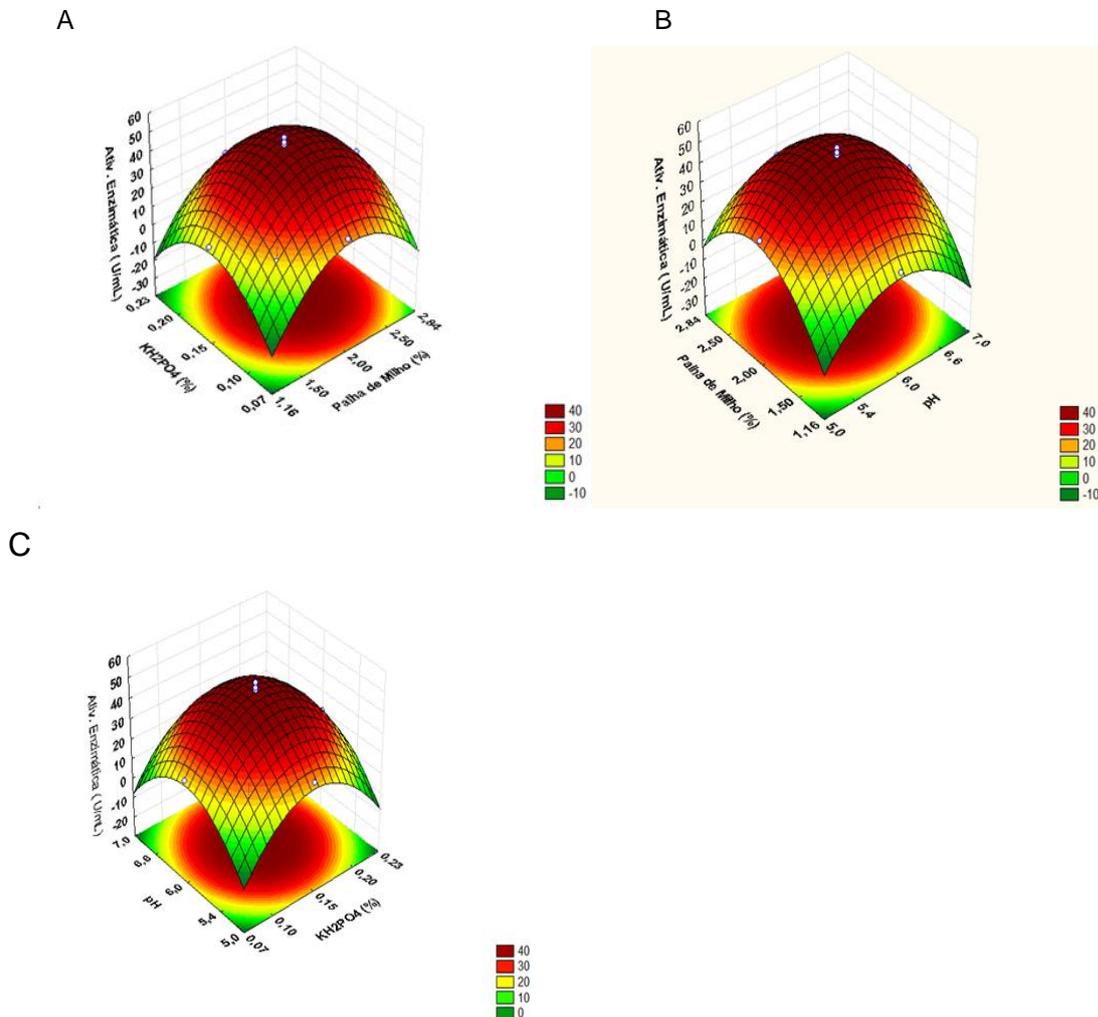


Figura 2. Superfícies de Respostas para produção de xilanase por *P. Crustosum*. Interações entre Palha de milho x KH_2PO_4 (A), Palha de Milho x pH (B) e KH_2PO_4 x pH (C)

Nos últimos anos, vários estudos demonstram vantagens do uso de metodologias estatísticas para otimização de processos fermentativos microbianos. Segundo Cui e Zhao (2012) o DPB combinado com planejamento fatorial completo, Box Behnken otimizou a produção de xilanase do *Penicillium* sp. WX - Z1, e alcançou a produção máxima de xilanase em 44,72 U/mL [22]. Todos esses relatos mostram a importância de otimizar os compostos nutricionais do cultivo para produção de enzimas por fungos filamentosos.

Li e colaboradores (2007) utilizaram variáveis como concentração da fonte de carbono (farelo de trigo: 35,6 g/L), pH 7,72, e tempo de cultivo: 142,3 h e obtiveram melhora na produção de xilanase do *P. oxalicum* ZH - 30, inclusive os resultados obtidos mostraram efeitos significativos em termos lineares e quadráticas com as três variáveis, utilizando análise de superfície de resposta, atingindo a produção máxima de 14,91 U/mL de xilanase [23]. O fungo *Chaetomium thermophilum* IMI 291753 também aumentou a produção de xilanase ao utilizar o planejamento experimental, com palha de trigo em cultivo submerso 3,9% (p/v) e nitrato de sódio 0,7% (p/v), como variáveis [24].

3.3 Influência do pH e estabilidade ao pH da xilanase de *P. crustosum*

A influência do pH sobre a atividade da xilanase de *P. crustosum* está representada na Figura 3. O pH ótimo da enzima foi observada no pH 5,5. As xilanases dos fungos *P. purpurogenum* [25], *P. janthinellum* [26], *P. expansum* [27] também apresentaram pH ótimo de 5,5 enquanto que do *Penicillium* sp. ZH-30 foi em pH 6,0 [28].

A xilanase do fungo *P. crustosum* exibiu estabilidade em ampla faixa de pH (5 a 8) no período de até 108 horas de incubação. Entretanto, em pH 4,5 a enzima permaneceu estável somente por 4 horas (Figura 5A). Essa estabilidade da enzima em uma ampla faixa de pH indica potencial de aplicação em diferentes processos industriais que requer essas características.

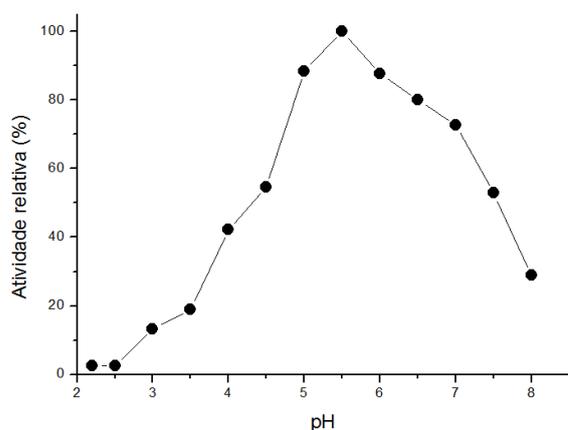


Figura 3- Influência do pH sobre a atividade da enzima xilanase do fungo *P. crustosum*

3.4 Determinação da temperatura ótima e termoestabilidade de xilanase do fungo *P. crustosum*

O efeito da temperatura na atividade da xilanase de *P. crustosum* está representado na Figura 4, em que a maior atividade de xilanase foi verificada a 50°C, similar a outros estudos com *Penicillium* spp, cuja temperatura ótima observada foi entre 40°C e 50°C [29, 30]. Em geral as xilanases fúngicas demonstraram temperatura ótima próxima de 50 °C [31, 32].

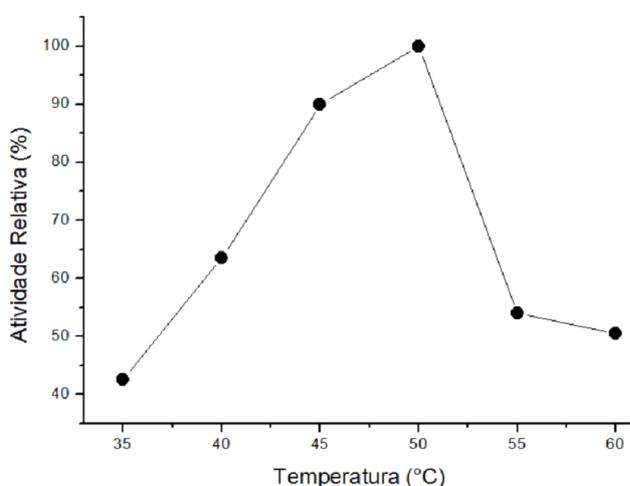


Figura 4. Influência da temperatura sobre a atividade da enzima xilanase do fungo *P. crustosum*

Esta enzima exibiu estabilidade térmica nas temperaturas de 40 e 50°C até 120 minutos, enquanto que a 60 °C a atividade residual diminuiu para 52%. Estes resultados indicaram claramente que as temperaturas adequadas para aplicação industrial dessa xilanase de *P. crustosum* está entre 40-60°C, com estabilidade durante 2 horas (Figura 5B). Similarmente, a xilanase de *P. janczewski* também apresentou termoestabilidade entre 40-60°C, e temperatura ótima de 50°C [16]. Li e colaboradores (2007) relataram que a temperatura adequada da xilanase de *P. oxalicum* ZH-30 foi de 50-60°C [28]. Entretanto, as xilanases de *P. purpurogenum* perderam cerca de 40% de suas atividades quando mantida durante 3 h a 60 °C [33].

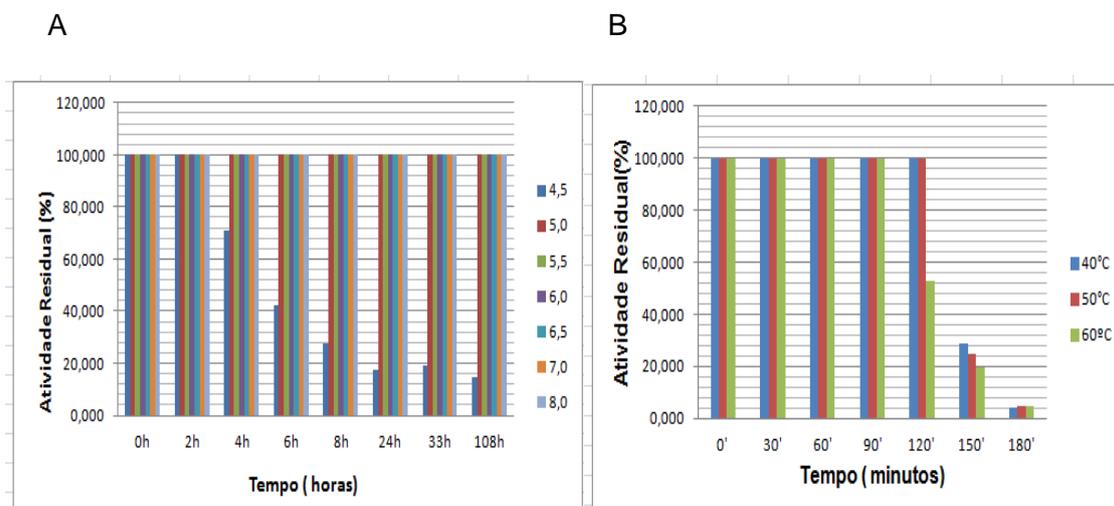


Figura 5. Estabilidade da enzima ao pH (A) e termoestabilidade da xilanase produzida pelo *P. crustosum* (B)

3.5 Aplicação da xilanase de *P. crustosum* no branqueamento da polpa Kraft

A eficácia da xilanase de *P. crustosum* foi observada após o tratamento da polpa celulósica com a enzima, pois houve redução do número Kappa em 5,27 pontos, que corresponde uma eficiência Kappa de 35,04% (Tabela 5). Esta eficiência pode também ser comprovada pela liberação de açúcares redutores e de cromóforos a partir da polpa, sendo esta última maior a 237 nm, Segundo Gary e colaboradores (1998) a liberação de cromóforos é um excelente indicador do efeito das xilanases sobre a polpa celulósica, sendo melhor que a própria liberação de açúcares redutores [34]. Porém, esses açúcares são continuamente produzidas como resultado da ação das xilanases sobre os xilooligossacarídeos liberados pela hidrólise inicial do xilano que reveste a superfície das fibras. Similarmente a este estudo, a liberação de açúcares redutores de polpas por meio da utilização de xilanases também foi observada por Jiang et al., 2006; Medeiros et al, 2007; e Nagar et al.,2013 [35,36, 37].

Tabela 5. Branqueamento da polpa kraft tratada com xilanase produzida por *P. crustosum*

Parâmetros	Controle	Xilanase do <i>P. crustosum</i>
Número kappa	15,04	9,77
Kappa eficiência (%)	-	35,04
CST (%)	20,32	20,27
Açúcares redutores (g/50 g polpa)	0,124	0,279
Abs 237 nm	0,052	0,215
Abs 465 nm	0,033	0,122

CST (%) – Viscosidade. Controle negativo: água destilada e polpa celulósica; material cromóforo monitorado nos comprimentos de onda de 237 nm e 465 nm. Dosagem de açúcares redutores (Miller, 1959). Branqueamento da polpa celulósica com 25 U/g de xilanase em tampão McIlvaine pH 6,5 a 50 °C por 120 min.

A redução no número Kappa obtida no presente estudo com as xilanases de *P. crustosum* é superior a outros reportados na literatura, os quais verificaram uma redução entre 0,9 a 4,6 unidades [38]. Kumar e colaboradores (2009) verificaram que a xilanase de *T. lanuginosus* MC 134, foi capaz de reduzir o número Kappa em apenas 3,2 pontos empregando-se uma dosagem enzimática de 50 U/g polpa seca por 3 horas [39]. No estudo de Peixoto-Nogueira e colaboradores (2009) as xilanases de *A. fumigatus* promoveram uma redução no número kappa de apenas 1,1 unidades, correspondendo eficiência de 11,7% [40]. Enquanto que as xilanases de *A. niger* foram aplicadas no processo de biobranqueamento da polpa kraft, uma redução de 3,62 unidades no número Kappa, sendo equivalente a 25,93% de eficiência Kappa [41].

A xilanase de *P. crustosum* proporcionou liberação de quantidade significativa de açúcar redutor no processo de branqueamento da polpa Kraft de Eucaliptus. E a viscosidade da polpa não foi alterada após tratamento enzimático, resultado que explica a razão pelo nível insignificante de atividade celulásica encontrada no filtrado de *P. crustosum*. De acordo com Khonzue e colaboradores (2011) a viscosidade da polpa depende do comprimento da cadeia celulósica e, por esta razão, indica indiretamente o grau de danos às fibras celulósicas durante o processo de polpação e de branqueamento [42].

4. CONCLUSÃO

A produção de xilanase por *P. crustosum* foi otimizada combinando duas metodologias de planejamento estatístico, o Plackett-Burman(PBD) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com análise de superfície e resposta. Pode-se concluir que houve um aumento na produção de xilanase por este fungo, na ordem de 14 vezes quando comparado à produção inicial sem otimização. Além disso, a xilanase de *P. crustosum* exibiu estabilidade a temperatura de 40-60°C e em pH (5,0 a 8,0). A enzima foi eficaz no processo de branqueamento da polpa Kraft de Eucaliptus, com redução significativa em 5,27 pontos do número Kappa e eficiência Kappa de 35,04%, sem alterar a viscosidade da polpa. Portanto, esta xilanase apresenta potencial para aplicação em indústria de papel e celulose.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Senthilkumar S.R., Ashokkumar B., Chandra Raj K., Gunasekaran. P., 2005. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresour Technol.*, **96**, 1380–1386.
- [2] Cai H., Shi P., Bai Y., Huang H., Yuan T., et al., 2011. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. *Process. Biochem.*, **46**, 2341-2346.
- [3] Heinen P. R., Henn C., Peralta R. M., Bracht A., Simão R. C. G., et al., 2014. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: Properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. *Afr J Biotechnol.*, **13**, 1047-1055.
- [4] Polizeli M. L. T.M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J.A, et al., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 577-591.
- [5] Kheng, P. P., Omar, I. C., 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *J. Sci. Technol.*, **27**, 325-336.

- [6] Funaguma T., Naito S., Morita M., Okumura M., Sugiura M., et al, 1991. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* banierand sartory. Agric Biological Chem., **55**, 1163–1165.
- [7] Farrell R. L., Biely P., McKay D. L., 1996. Production of hemicellulase by the fungus *Penicillium kloeckeri*. In: Srebotnik E, Messner K, editors. Biotechnology in the pulp and paper industry. Proceedings of the 6th international conference on biotechnology pulp paper industry. p. 485–489.
- [8] Cui F., Li Y., Xu Z., Xu H., Sun K., et al., 2006. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. Bioresour Technol., **97**, 1209–1216.
- [9] Zhang X., Li Y., Zhuge J., 2006. Optimization of 1,3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology. J Chem Technol Biotechnol., **81**, 1075–1078.
- [10] Dobrev G. T., Pishtiyski I. G., Stanchev V. S., Mircheva R., 2007. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. Bioresour. Technol., **98**, 2671-2678.
- [11] Ahmed S., Imdad S.S., Jamil A., 2012. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. Electron. J. Biotechnol., **15**.
- [12] Yeasmin S, Kim C.H., Park H.J., Sheikh M.I., Lee J.Y., et al., 2011. Cell surface display of cellulase activity-free xylanase enzyme on *Saccharomyces cerevisiae* EBY100. Appl Biochem Biotechnol, 164: 294-304.
- [13] Khonzue P, Laothanachareon T, Rattanaphan N, Tinnasulanon P, Apawasin S, et al., 2011. Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. Biosci Biotechnol Biochem 75: 1129-1134.
- [14] Medeiros, R.G., Silva Jr, F. G, Bao, S.N., Hanada, R., Filho E.X.F., 2007. Application of xylanases from Amazon forest fungal species in bleaching of eucalyptus kraft pulps. Braz Arch Biol Technol **50**: 231-238.
- [15] Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Betini J.H.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., et al., 2009. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. J Ind Microbiol Biotechnol **36**: 149-155.
- [16] Terrasan, C.R.F., Temer, B., Sarto, C., Silva Junior, F. G., Carmona, E.C., 2013. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: production,

physico-chemical properties and application of the crude extract to pulp biobleaching. *Bioresour.* **8**(1): 1292-1305.

[17] White, T. J., Bruns, T., Lee, S. T., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T. J. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press.

[18] Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426-489.

[19] TAPPI – Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1985. TAPPI Standard Methods, T 236 om-85.

[20] TAPPI – Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1982. TAPPI Standard Methods, T 230 om-82.

[21] Betini, J.H.A., Michelin, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., et al., 2009. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng.*, **32**: 819-824.

[22] Cui, F., Zhao, L., 2012. Optimization of Xylanase Production from *Penicillium* sp.WX-Z1 by a Two-Step Statistical Strategy: Plackett-Burman and Box-Behnken Experimental Design. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 10630-10646.

[23] Li, Y., Cui, F., Liu, Z., Xu, Y., Zhao, H., 2007. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme Microb Tech.*, **40**, 1381–1388.

[24] Katapodis, P., Kekos, V. D., Christakopoulou, P., 2007. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. *Biochem Eng J.*, **35**, 136–141.

[25] Steiner, J., C. Socha and J. Eyzaguirre, 1994. Culture conditions for enhanced cellulose production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World J Microb Biot.*, **10**: 280-284.

[26] Oliveira, L.A., A.L.F. Porto and E.B. Tambourgi, 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresour Technol.*, **97**: 862-867.

[27] Querido, A. L. S., Coelho, J. L. C., Araujo, E. F., Chaves-Alves, V. M., 2006. Partial Purification and Characterization of Xylanase Produced by *Penicillium expansum*, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **49**: 475-480.

[28] Li, Y., Z. Liu, F., Cui, Y., Xu, J.H., 2007. Production of xylanase from a newly isolated *Penicillium* sp ZH-30. *World J Microb Biot.*, **23**: 837-843.

- [29] Krogh, K.B.R., A. Morkeberg, J., Jorgensen, J.H.C., Frisvad, L., 2004. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **114**: 389-401.
- [30] Ryan, S.E., K. Nolan, R., Thompson, G.M., Gubitz, A.V., Savage, M.G., 2003. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme Microb Technol.*, **33**: 775-785.
- [31] Bakir, U.S., Yavascaoglu, F., Guvenc, A., 2001. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Technol.*, **29**: 328-334.
- [32] Carmona, E.C., M.B. Fialho, E.B. Buchgnani, G.D. Coelho, M.R. Brocheto-Braga, J.A., 2005. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem.*, **40**: 359-364.
- [33] Belancic, A.J., Scarpa, A., Peirano, R., D'iaz, J., Steiner, J., 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties. *J. Biotechnol.*, **41**: 71-79.
- [34] Garg A. P., Roberts J. C. and McCarthy A. J., 1998. Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 594-598.
- [35] Jiang, Z. Q., Li, X. T., Yang, S. Q., Li, L. T., Feng, W. Y., 2006. Bioblast boosting effect of recombinant xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on wheat straw pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**: 65-71.
- [36] Medeiros, R. G., Da Silva Jr, F. G., Bao, S. N., Hanada, R., Ferreira Filho, E. X., 2007. Application of Xylanases from Amazon Forest Fungal Species in Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulps. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **50**: 231-238.
- [37] Nagar S, Jain R.K., Thakur V.V., Gupta V.K., 2013. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus*. *3 Biotech* **3**: 277-285.
- [38] Li, X.T., Jiang, Z.Q., Li, L.T., Yang, S.Q., Feng, W.Y., Fan, JY., Kusakabe, I., 2005. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresour Technol.* 96(12):1370-9.
- [49] Kumar, K.S., Manimaran, A., Permaul, K., 2009. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J Biosci Bioeng.*, **107**(5):494-498.

[40] Peixoto-Nogueira S.C., Michelin M., Betini J.H.A., Jorge J.A., Terenzi H.F., Polizeli M.L.T.M., 2009. Production of xylanase by *Aspergillus* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *J Ind Microbiol Biot* **36**:149–155.

[41] Guimaraes, N.C.A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Betini, J.H.A., Zanoelo, F.F., Marques, M.R., Polizeli, M.L.T.M., Giannesi, G.C., 2013. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agro-industrial residues as substract. *SpringerPlus* **2**: 380-387.

[42] Khonzue, P., Laothanachareon, T., Rattanaphan, N., Tinnasulanon P, Apawasin S, Paemanee A, Ruanglek V, Tanapongpipat S, Champreda V, Eurwilaichitr L. Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011; **75**(6):1129–1134.