

PRODUÇÃO DE XILANASE POR *PENICILLIUM SP.* UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

N. A. DARONCH¹, J. ZENI¹, L. N. SALAZAR¹, G. TONIAZZO¹, R. L. CANSIAN¹, N. L. D. NYARI¹, E. MALVESSI²

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos

²Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia
E-mail para contato: naionaradaronch@hotmail.com

RESUMO – Neste trabalho objetivou-se otimizar a produção de xilanase a partir do micro-organismo *Penicillium sp.* em termo de concentração de esporos e umidade. Para a determinação dos valores da concentração de esporos e umidade foi realizado um planejamento fatorial completo 2², onde a concentração de esporos variou de 4,6Log a 7,4Log e umidade de 34% a 76%. A determinação da atividade residual foi realizada adicionando-se 0,2mL de enzima a 1,8 mL de Xilana 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,3 segundo metodologia de Bailey *et al.* (1992). De acordo com os resultados obtidos noplanejamento estatístico experimental, a atividade para xilanase apresentou a maior atividade enzimática (435,35U/g) com concentração de esporos 7Log e umidade de 70%.

1. INTRODUÇÃO

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

Na natureza, o interesse pela hidrólise da xilana se dá pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico, dos quais, principalmente as xilanases é que fazem parte desse complexo e são responsáveis pela hidrólise da xilana (LEE *et al.*, 2009).

A maior aplicação industrial 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 (WONG *et al.*, 2001).

Com base no que foi abordado anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi a otimização da produção da enzima celulase em fermentação em estado sólido por *Penicillium sp.*, empregando substrato agroindustrial de casca de soja, variando as concentrações de esporos e a umidade do substrato, usando planejamento estatístico de experimentos.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção de xilanase

A produção da enzima xilanase foi realizada através do crescimento do fungo identificado como *Penicillium sp.* em 10g de substrato de casca de soja, com a umidade regulada no substrato com variações de 34U%, 40U%, 55U%, 70U% e 76U% e variações de concentração de esporos 4,6Log, 5Log, 6Log, 7Log e 7,4Log. A germinadora se manteve com umidade 100% e temperatura de 30°C.

2.1.1 Substrato Agroindustrial

O resíduo agroindustrial utilizado foi a casca de soja cedida Empresa Olfar, Erechim/RS.

2.1.2. Efeito da concentração de esporos

Para avaliar se a quantidade de esporos apresentava algum efeito na produção de enzima celulase foram realizados estudos em diferentes concentrações de esporos de *Penicillium sp.* de 4×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e $2,5 \times 10^7$ esporos por grama de meio úmido e tempos de bioprodução de 7 e 14 dias, respectivamente.

O teor de umidade é um fator determinante no crescimento dos micro-organismos, portanto foi analisada a influência do teor de umidade na produção enzimática de celulase em diferentes tempos de bioprodução (7 e 14 dias). No meio de bioprodução composto por casca de soja foi ajustada a umidade a 34, 40, 55, 70 e 76 % (b.u.). A quantidade volumétrica de água a ser adicionada foi dimensionada através de cálculo de balanço de massa, descontando a umidade inicial da mistura e a alíquota de suspensão de esporos.

Como estratégia foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes foram: concentração de esporos (X_1), e umidade (X_2). A Tabela 1 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. A variável dependente (resposta) foi a medida da atividade residual (U/g), Xilanase.

Tabela 1: Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de celulase.

| Variáveis Independentes | Códigos | Níveis | | | | |
|-------------------------|---------|--------|----|----|----|-------|
| | | -1,41 | -1 | 0* | +1 | +1,41 |
| [] esporos (Log) | X_1 | 4,6 | 5 | 6 | 7 | 7,4 |
| Umidade (%) | X_2 | 34 | 40 | 55 | 70 | 76 |

* Triplicata do ponto central

2.1.3 Extração Enzimática

Após cada tempo de fermentação (7 e 14 dias) 10g de meio fermentado foi transferido para *elernmeyer* de 250mL e diluído em solução de citrato de sódio 0,2M pH 4,9 na razão 1:15 (3,33g de substrato fermentado para 50 mL de tampão). Os frascos foram colocados em um agitador orbital mecânico (Nova Ética, incubadora 430 RDB) por 30 minutos a 50°C e 100 rpm.

2.1.4 Determinação da atividade de Xilanase

Técnicas para medir a atividade de celulase total são necessárias para comparar a eficácia da atividade da celulase entre micro-organismos ou suas enzimas secretadas. A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana “birchwood” (Sigma), conforme descrito por BAILEY *et al.* (1992). Os açúcares redutores (como a D-xilose) foram dosados espectrofotometricamente, pelo método do DNS (MILLER, 1959), envolvendo quatro categorias de reações: tubos das amostras a serem quantificadas (atividade enzimática); tubo do branco reacional (para zerar o espectrofotômetro) e tubos controle da enzima (enzima e/ou extrato enzimático sem substrato).

A solução de xilana 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,3, foi previamente aquecida, adicionando-se 1,8mL da solução em tubos que são incubados em banho termostatzado, a 50 °C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 200 µL da enzima e/ou extrato enzimático, incubando-se a mistura por 5 minutos. Desta, retirou-se 0,5 mL, que foram adicionados a 0,5 mL de DNS. Esta reação foi conduzida em banho de água fervente por 5 minutos, sendo paralisada com o resfriamento da solução em banho de gelo. Após a adição de 8 mL da solução tartarato de sódio e potássio, a absorbância das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm, contra um branco reacional.

2.1.5 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias, com o Software *Statistica* versão 8.0, a nível de significância de 95 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a Xilanase com 7 dias de fermentação a máxima atividade foi de 215,08 U/g (Ensaio 9, Tabela 2), onde o meio de cultivo apresentava as concentrações de 10 g de casca de soja com a concentração de esporos igual a 6Log e umidade igual a 55%. Já para a Xilanase com 14 dias de fermentação a máxima atividade foi de 435,35U/g (Ensaio 4, Tabela 2), onde o meio de cultivo apresentava as concentrações de 10 g de casca de soja com a concentração de esporos igual a 7Log e umidade igual a 70%.

Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2² valores reais e codificados e respostas em determinação da atividade de Xilanase.

| | <i>X1</i> (<i>conc. de esporos</i>) | <i>X2</i> (<i>U%</i>) | Xilanase (U/g) 7 dias | Xilanase (U/g) 14 dias |
|-----------|--|----------------------------|--|---|
| 1 | -1 (1.10 ⁵) | -1 (40) | 75,70 | 36,76 |
| 2 | 1 (1.10 ⁷) | -1 (40) | 50,00 | 35,48 |
| 3 | -1 (1.10 ⁵) | 1 (70) | 179,79 | 416,58 |
| 4 | 1 (1.10 ⁷) | 1 (70) | 179,00 | 435,35 |
| 5 | -1,41 (4.10 ⁴) | 0 (55) | 155,28 | 128,97 |
| 6 | 1,41 (2,5.10 ⁷) | 0 (55) | 178,58 | 220,86 |
| 7 | 0 (1.10 ⁶) | -1,41 (34) | 33,73 | 21,62 |
| 8 | 0 (1.10 ⁶) | 1,41 (76) | 187,00 | 220,00 |
| 9 | 0 (1.10 ⁶) | 0 (55) | 215,08 | 210,00 |
| 10 | 0 (1.10 ⁶) | 0 (55) | 200,00 | 224,42 |
| 11 | 0 (1.10 ⁶) | 0 (55) | 215,00 | 222,02 |

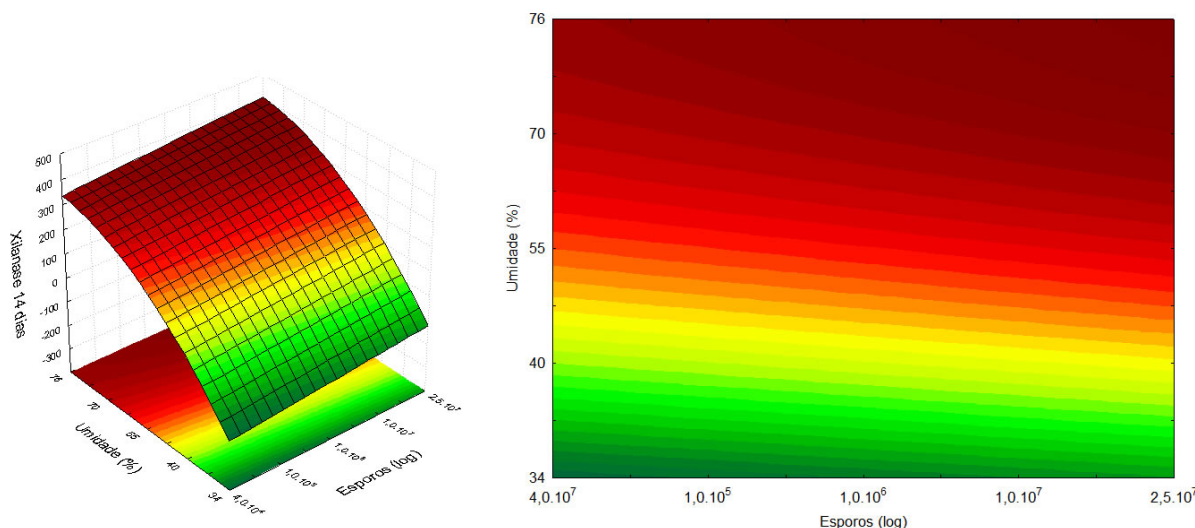
X₁= concentração de esporos (Log); X₂= umidade (%). Variáveis independentes fixas: 30°C.

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da xilanase em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 17,74 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 1 demonstrando que a máxima produção de Xilanase em 7 dias se dará com concentração de 6Log e 55% de umidade, referente ao ensaio 9.

$$\text{Xilanase} = 210,00 - 26,01 \cdot X_1^2 + 56,31 \cdot X_2 - 54,47 \cdot X_2^2 \quad (1)$$

Onde, Xilanase = Atividade de Xilanase (U/g); X₁= Concentração de esporos (Log), X₂= Umidade (%).

Figura 01: Superfícies de resposta e curvas de contorno em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de Xilanase (U/g).

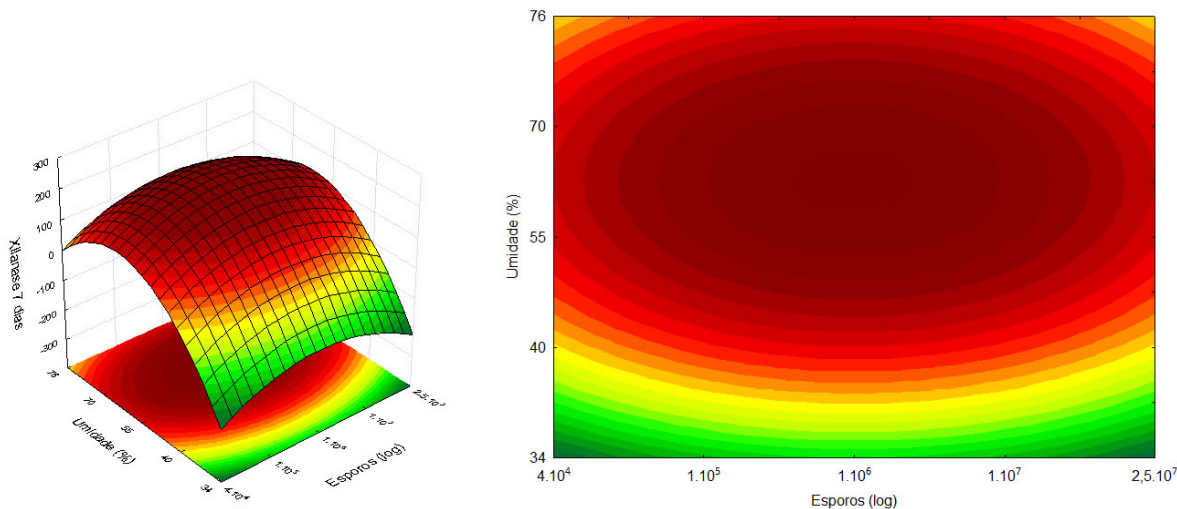


A Equação 2 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da Xilanase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,87 e F calculado 1,81 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 02 demonstrando que a máxima produção de Xilanase em 14 dias se dará com concentração de 7Log e 70% de umidade, referente ao ensaio 4.

$$\text{Xilanase} = 218,48 + 18,44 \cdot X_1 + 132,82 \cdot X_2 - 28,10 \cdot X_2^2 \quad (2)$$

Onde, Xilanase = Atividade de Xilanase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log), X_2 = Umidade (%).

Figura 02: Superfícies de resposta e curvas de contorno em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de Xilanase (U/g).



4. CONCLUSÃO

Neste trabalho observou-se que a concentração de esporos não apresenta diferença significativa quando comparado no mesmo tempo de fermentação, porém pôde-se observar que o teor de umidade são variáveis importantes na produção da enzima FPase. O melhor rendimento foi verificado quando utilizado casca de soja a uma concentração de esporos de 5×10^5 /10 gramas de bioproduto no tempo de 7 dias (1,19U/g) e o teor de umidade de 70%, quando comparado ao tempo de 14 dias (0,94 U/g) no valor da atividade enzimática. Portanto, o sucesso da produção comercial de enzimas depende dos parâmetros de processo, visando à minimização dos custos do meio de cultura utilizado na fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Uri Erechim, FAPERGS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

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

LEE, J. W.; PARK, J. Y.; KWON, M.; CHOI, I. G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 - 428, 1959.

WONG, K. K. Y.; ALISON, R. W.; SPEHR, S., Effects of alkali and oxygen extractions of kraft pulp on xylanase-aided bleaching. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 27, p. 229-234, 2001.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 170-176, 2004.