

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Thermoascus aurantiacus***  
**EM MEIO SEMI-SÓLIDO**

Dissertação de mestrado apresentada  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Industrial.

**Banca examinadora:**

Ora. Adriane Maria Ferreira Milagres (presidente)

Ora. Maria Helena Andrade Santana

Dr. Adalberto Pessoa Jr.

**Estudante:**

Marta Cristina de Oliveira Souza

Lorena - SP- Brasil

1998

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

OBTENÇÃO DE XILANASES POR *Thermoascus aurantiacus*  
EM MEIO SEMI-SÓLIDO



Este exemplar corresponde a versão final da dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora.

  
Ora. Ana Maria Ferreira Milagres  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Lorena - SP - Brasil

*Aos meus pais, Walter e Catarina;*

*Aos meus irmãos;*

*Ao Álvaro, meu noivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por iluminar minha vida.

Ao Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, pelo apoio e oportunidade de realização deste curso.

À Ora. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela orientação, pelas críticas e sugestões durante a realização desse trabalho, fundamentais para meu enriquecimento profissional e pessoal.

À colaboração que sempre recebi de todos docentes e funcionários do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, especialmente aos professores Arnaldo Márcio Prata e Inês Roberto, e ao funcionário Djalma, pela contribuição e atenção em vários momentos.

À professora Dra. Maria Helena Andrade Santana, pelas valiosas sugestões e colaboração no desenvolvimento dos ensaios em reator.

Por nunca limitarem esforços, é com imensa gratidão que agradeço a meus pais, pelo auxílio, apoio e compreensão nesta caminhada.

Especialmente ao Álvaro, pelo amor, compreensão e participação fundamental em todos os momentos.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Estendo os agradecimentos à todos, os quais não citei os nomes, mas que de algum modo me auxiliaram na concretização deste trabalho.

***Muito Obrigada!***

## **BIOGRAFIA**

Marta Cristina de Oliveira Souza, filha de Walter José de Souza e Catarina de Oliveira Souza, nasceu em Guarulhos, Estado de São Paulo, a 29 de Outubro de 1971.

Recebeu o título de Engenheira Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, no ano de 1995.

Em março de 1996, iniciou no curso de Mestrado em Biotecnologia Industrial da Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

## RESUMO

### **Produção de Xilanase por *Thermoascus aurantiacus* em meio semi-sólido**

Marta Cristina de Oliveira Souza. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, CP 116, CEP 12600-000, Lorena, SP, Brasil). Banca examinadora: Dra. Adriana Maria Ferreira Milagres, Dra. Maria Helena Andrade Santana e Dr. Adalberto Pessoa Júnior. Outubro de 1998.

No presente trabalho estudou-se a produção de xilanase pelo fungo *T. aurantiacus* através da tecnologia da fermentação semi-sólida. Na primeira etapa desse estudo foram definidas algumas condições de cultivo e extração da xilanase. Farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados como substratos, e na concentração de 32% (p/v) induziram os melhores níveis de atividade, 954U/g e 1012U/g, respectivamente. A granulometria e a massa de substrato afetaram a produção de xilanase, porém o teor de proteína das culturas não se modificou, mesmo após adição de extrato de levedura (0,32%) ou glicose (0,1%) aos meios. Sucessivas extrações da enzima mostraram que três lavagens foram suficientes para recuperar 90% da atividade de xilanase produzida. Um aumento na temperatura de extração, de 25 para 50°C não favoreceu a extração da enzima. Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo induziram níveis semelhantes de atividade de xilanase, porém o bagaço de cana-de-açúcar foi escolhido para a continuidade desse trabalho devido ao seu baixo conteúdo protéico.

Na etapa seguinte, foi realizada uma triagem das variáveis importantes para o processo de produção de xilanase de *T.aurantiacus* em meio semi-sólido, utilizando frascos Erlenmeyer. Foram utilizados conceitos de estatística multivariada, com a aplicação da técnica do planejamento fatorial fracionado e completo e estudados os efeitos das variáveis: umidade inicial do meio, concentração de inóculo, massa de substrato e tempo de cultivo. A umidade inicial do meio e a massa de substrato foram as variáveis que mais influenciaram na produção de atividade de xilanase em meio semi-sólido. Em seguida, foi feita a quantificação dos níveis das variáveis significativas mediante o emprego da metodologia da superfície de resposta, que resultou em um modelo matemático com 95% de confiança.

As melhores condições de produção de atividade de xilanase foram 17g secas de bagaço de cana-de-açúcar, inoculados com  $10^4$  ascosporos/g de substrato e 81 % de umidade inicial, incubados durante 10 dias, em Erlenmeyer de 300 mL, em condições estáticas a 45°C.

A partir da condição otimizada, foram realizados novos ensaios para construção de curvas de produção da enzima em Erlenmeyer e em um reator de leito fixo. O perfil cinético destas curvas mostrou que, em Erlenmeyer, a máxima atividade de xilanase (2880 U/g) foi 2,5 vezes o valor obtido quando foi empregado o reator de leito fixo (1150 U/g). Também em termos de produtividade de xilanase, o melhor resultado obtido em Erlenmeyer foi 2,3 vezes maior que a máxima produtividade em reator de leito fixo.

## ABSTRACT

### Xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* in semi-solid medium

Xylanase production by *T. aurantiacus* fungus using semi-solid fermentation technology was investigated in this study. Initially, some conditions for cultivation and for xylanase extraction were established. Wheat bran and sugar cane bagasse were used as substrates, inducing this highest activity levels (954 U/g and 1012 U/g, respectively) at the concentration of 32% (p/v). Granulometry and substrate mass affected the production of xylanase, however the protein content of the culturas did not change, even after the addition of yeast extract (0.32%) or glucose (0.1%) to the media. Successive enzyme extractions showed that leaching three times was sufficient to recover about 90% activity of the xylanase produced. Raising the temperature from 25 to 50°C did not favour the enzyme extraction. Sugar cane bagasse and wheat bran induced similar levels of xylanase activity. However, sugar cane bagasse was chosen for the continuation of this work, because of its low content of protein.

In the next step, a selection was made of the most important variables for the process of xylanase production by *T. aurantiacus* in semi-solid medium using Erlenmeyer flasks. Multivariate statistical concepts were employed with the complete and fractional factorial designs technique, and the effects of the following variables were studied: initial moisture in the medium, inoculum concentration, substrate mass and cultivation time. The initial moisture in the medium and the substrate mass were the variables with the most influence on the production of xylanase activity in semi-solid medium. Afterwards, the levels of the significant variables were quantified by means of the response surface methodology, which resulted in a mathematical model with 95% confidence.

The best conditions for production of xylanase activity were 17 dry g of sugar cane bagasse inoculated with 10<sup>4</sup> ascospores/g of substrate and 81% of initial moisture, incubated for 10 days in 300 ml Erlenmeyer flasks under static conditions, at 45°C.

Under optimized conditions additional assays were conducted for obtaining curves of enzyme production in Erlenmeyer flasks and in a fixed-bed reactor. The kinetic profile of these curves showed that in Erlenmeyer flasks, the maximum xylanase activity (2880 U/g) was 2.5 times the value obtained when the fixed-bed reactor was employed (1150 U/g). Also concerning xylanase productivity, the best result obtained in Erlenmeyer flasks was 2.3 times the value of the maximum productivity obtained in fixed-bed reactor.

---

## CONTEÚDO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>v</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1 - FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	3
2.2 - CONTROLE DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO	5
2.2.1 - <i>Umidade e Atividade de Água</i>	6
2.2.2- <i>Temperatura e Transferência de Calor</i>	9
2.2.3 - <i>Substratos</i>	10
2.2.4 - pH	12
2.2.5 - <i>Aeração e Transferência de Oxigênio</i>	12
2.2.6 - <i>Agitação</i>	13
2.3 - FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA X FERMENTAÇÃO SUBMERSA	14
2.4 - Uso DE REATORES PARA FERMENTAÇÕES SEMI-SÓLIDAS	15
2.5 - ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA.	18
2.6 - XILANASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO	19
2.7 - XILANASES DE <i>Thermoascus aurantiacus</i>	21
<b>3 - OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1 - MICRORGANISMO	25
4.2 - SUBSTRATOS	25
4.3 - MEIOS DE CULTURA.	26
4.3.1 - <i>Meio de Manutenção do Fungo</i>	26
4.3.2- <i>Meio Básico</i>	26
4.4 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO	26
4.5 - CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE XILANASE EM ERLENMEYER	27
4.6 - EXTRAÇÃO DA ENZIMA	27
4.7 - ANÁLISES	28
4.7.1 - <i>Umidade Final</i>	28
4.7.2 - <i>Atividade Enzimática</i>	28
4.7.3 - <i>Medida do Crescimento de T. aurantiacus em bagaço de cana de açúcar</i>	28
4.7.4 - <i>Teor de Proteína</i>	29
4.8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.	31
4.9 - OBTENÇÃO DE XILANASE EM REATOR DE LEITO FIXO	31



4.9.1 - <i>Produção de CO<sub>2</sub></i>	32
4.10 - AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	33
4.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.	33
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
5.1 - PARTE I - PRODUÇÃO DE ATIVIDADE DE XILANASE POR <i>Thermoascus aurantiacus</i>	34
5.1.1 - <i>Efeito do Tipo e Concentração do Substrato</i>	35
5.1.2 - <i>Extração da Xilanase</i>	41
Efeito de Sucessivas Extrações	42
Efeito da Temperatura de Extração	44
5.1.3 - <i>Determinação do Crescimento de <i>T. aurantiacus</i></i>	46
Crescimento em Glicose	46
Crescimento em Bagaço de Cana-de-Açúcar	48
5.1.4 - <i>Efeito da Massa de Bagaço de Cana-de-Açúcar</i>	50
5.1.5 - <i>Efeito da Granulometria do Bagaço</i>	51
5.2 - PARTE II - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE EM ERLLENMEYER	54
5.2.1 - <i>1ª Fase do Planejamento Estatístico - Fatorial Fracionado</i> <sup>24-t</sup>	55
5.2.2 - <i>7ª Fase do Planejamento Estatístico - Passo Ascendente</i>	59
5.2.3 - <i>J8ª Fase do Planejamento Estatístico - Planejamento Estrela</i>	60
5.2.4 - <i>Curva de Produção de Xilanase</i>	67
5.3 - PARTE III - PRODUÇÃO DE XILANASE EM REATOR DE LEITO FIXO	69
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>7 - SUGESTÕES</b>	<b>75</b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 - Evolução da velocidade específica de crescimento(-•-) e do tempo de germinação (-+- ) como função da atividade de água inicial do meio(Adaptado de RAIMBAULT, 1997)	8
FIGURA 2 - Esquema representando o sistema de fermentação semi-sólida em reator de leito fixo, para obtenção de xilanase	32
FIGURA 3 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de-açúcar (•)e farelo de trigo (+)na atividade de xilanase, expressa por volume de meio....	35
FIGURA 4 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de-açúcar(+) e farelo de trigo ( + ) na atividade de xilanase, expressa por grama de substrato	38
FIGURA 5 - Atividade de xilanase obtida por fermentação semi-sólida de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	.40
FIGURA 6 - Efeito de sucessivas extrações da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações	42
FIGURA 7 - Efeito de sucessivas extrações da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo farelo de trigo em diferentes concentrações	.43
FIGURA 8 - Efeito da temperatura na extração da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar	.45
FIGURA 9 - Crescimento (+)e variação do pH (•)durante de <i>T. aurantiacus</i> em meio líquido, contendo glicose	.47.
FIGURA 10 - Teor de proteína e atividades enzimáticas produzidas após diferentes condições de cultivo	49
FIGURA 11 - Efeito da massa de bagaço de cana-de-açúcar na atividade de xilanase	51
FIGURA 12 - Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na produção da atividade de xilanase	52
FIGURA 13 - Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo da EQUAÇÃO 2, que representa o processo de produção de atividade de xilanase em meio semi-sólido	66
FIGURA 14 - Curvas de obtenção de atividade de xilanase (+)e de produtividade ( • ) durante cultivo de <i>T. aurantiacus</i> em meio semi-sólido	

---

nas condições otimizadas em Erlenmeyer 67

FIGURA 15 - Produção de atividade de xilanase (•), produtividade (•) e evolução da produção de CO<sub>2</sub> (~) durante cultivo semi-sólido de *T. aurantiacus* em reator de leito fixo 70

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1 - Enzimas obtidas por fermentação em substratos sólidos	19
TABELA 2 - Fatores e níveis utilizados nos ensaios de cultivo de <i>T. aurantiacus</i> em meio semi-sólido	30
TABELA 3 - Matriz para um projeto fatorial $2^{4-1}$	30
TABELA 4 - Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ e resultados experimentais de atividade de xilanase	55
TABELA 5 - Efeitos estimados, erros-padrão e teste t de "Student" para o planejamento fatorial $2^{4-1}$ com 2 replicatas no ponto central.	56
TABELA 6 - Análise de variância para o estudo da produção de xilanase por fermentação semi-sólida no planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ com 2 replicatas no ponto central.	57
TABELA 7 - Planejamento experimental para obtenção do passo ascendente.	59
TABELA 8 - Planejamento fatorial completo $2^2$ com 4 pontos estrela e 2 repetições no ponto central e resultados experimentais	61
TABELA 9 - Efeitos estimados, valores do teste t de "Student" e erros-padrão obtidos no planejamento fatorial completo $2^2$ com estrela e dois ensaios no ponto central.	63
TABELA 10 - Análise de variância para o estudo da produção de xilanase por fermentação semi-sólida no planejamento fatorial completo $2^2$ com estrela e dois ensaios no ponto central..	63
TABELA 11 - Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de "Student" e nível de significância para o modelo matemático que representa o processo produção de xilanase por fermentação semi-sólida, utilizando planejamento experimental $2^2$ em estrela	64
TABELA 12 - Análise de variância da regressão para o modelo que representa o processo de produção de xilanase em meio semi-sólido no planejamento $2^2$ em estrela	64

## 1 - INTRODUÇÃO

O uso de enzimas com os mais diversos fins defronta com os altos custos dos processos tradicionais de sua produção em larga escala. No Brasil, onde existe enorme diversidade de biomassa vegetal e microbiológica, a produção de enzimas via fermentação desponta como alternativa economicamente viável ao emprego de enzimas na produção de bens de consumo disponíveis à sociedade.

Após a 1ª Grande Guerra, a tecnologia da fermentação submersa sobrepôs-se à tradicional fermentação semi-sólida, já utilizada desde os primórdios pelas civilizações ocidentais. Atualmente, os trabalhos na área de fermentação semi-sólida foram retomados face as suas vantagens em relação às possibilidades de utilização de substratos de baixo custo, como por exemplo resíduos industriais, menor potencial de geração de efluente líquido, às facilidades proporcionadas ao processo de "downstream", dentre outros. Assim, a produção de diversos produtos como ácido, cetonas, aldeídos, proteína microbiana, bem como uma variedade de enzimas enumeram as possibilidades de emprego desta tecnologia.

A enzima xilanase adquiriu vultoso potencial de aplicação nos mais diversos ramos industriais, impulsionado em grande parte pela sua facilidade de obtenção via microrganismo. Uma das mais importantes aplicações

biotecnológicas de xilanases é no branqueamento de polpas, reduzindo o consumo de reagentes químicos à base de cloro.

Apesar de inúmeras publicações científicas no campo da fermentação semi-sólida mensurarem atividade de xilanase, poucos entram no mérito da otimização das variáveis para a sua produção em biorreatores. Dentre os biorreatores destinados a fermentação semi-sólida, desponta como opção promissora o reator de leito fixo. Em vasta revisão bibliográfica, muito pouco se encontrou de referência da produção de xilanase via fermentação semi-sólida nesse sistema.

Sob este prisma, o presente trabalho objetivou-se nas atividades destinadas à obtenção de atividade de xilanase, inicialmente em escala de bancada, utilizando Erlenmeyer. Para tanto, utilizou-se a ferramenta do planejamento estatístico de experimentos para a definição de um modelo matemático que representasse o processo. Na etapa seguinte, o modelo estatístico definido anteriormente foi empregado na produção da enzima em reator de leito fixo, ainda em escala de bancada, e avaliado o perfil de produção no reator.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Fermentação semi-sólida é o processo microbiano que ocorre principalmente na superfície de materiais sólidos que têm a propriedade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis (ROUSSOS, 1997). Os materiais sólidos podem ou não ser biodegradáveis. Materiais lignocelulósicos e amiláceos são exemplos de substratos sólidos biodegradáveis que servem como principal fonte de nutrientes ao microrganismo. Em materiais não biodegradáveis, como por exemplo vermiculite, amberlite ou poliuretano, as necessidades nutricionais do microrganismo são suprimidas através da adição, no suporte inerte, de um meio de cultivo, o qual torna-se disponível ao microrganismo por adsorção ou capilaridade (MUDGETT, 1986; MAIORANO, 1990; ROUSSOS, 1997).

A técnica de produzir substâncias de interesse econômico utilizando materiais sólidos umedecidos com água e inoculados com certos tipos de microrganismos é um dos métodos mais antigos utilizados pelo homem para aproveitar-se das propriedades biossintéticas dos microrganismos. Têm-se registros que há cerca de 2600 anos antes de Cristo, o pão já era obtido por civilizações egípcias (PANDEY, 1992). Esta técnica vem sendo extensivamente usada desde a antiguidade nos países orientais, na Ásia e na África, para produção de alimentos fermentados, produção de cogumelos, fermentação de massas, queijos, etc. (MITCHELL, LONSANE, 1992). "Koji" é um exemplo de processo de fermentação semi-sólida tradicional no Japão, que utiliza arroz como substrato sólido, inoculado com o microrganismo *Aspergillus oryzae*

(RAIMBAULT, 1997). O produto obtido é uma mistura de enzimas amilolíticas e proteolíticas extracelulares, que podem ser utilizadas em outros processos fermentativos para hidrolisar outros substratos, alterando, por exemplo, o sabor dos alimentos (FROST, MOSS, 1987). Muitos outros alimentos fermentados são obtidos através do cultivo de microrganismos em substratos sólidos, como "tempeh" na Indonésia e "ragi" na Índia, que utilizam sementes cozidas de legumes como substrato sólido e uma variedade de microrganismos como inóculo. Na França, o "queijo azul" é produzido utilizando queijo fresco perfurado como substrato sólido e fungos selecionados, como *Penicillium roqueforti* como inoculante. Além dos tradicionais alimentos fermentados, novas versões da fermentação semi-sólida estão sendo inventadas. Por exemplo, estima-se que aproximadamente um terço da produção industrial de enzima no Japão, que utilizam o processo de fermentação semi-sólida e a fermentação "koji", estão sendo modernizadas para produção em larga escala de ácidos cítrico e itacônico (RAIMBAULT, 1997). Os países que dominam esta tecnologia, como por exemplo o Japão, têm dado especial atenção na implantação de plantas fermentativas automáticas (LONSANE *et al.*, 1992). O tradicional processo "Koji" conduzido em pequenas bandejas de bambu e madeira, está sendo gradualmente substituído por processos mais sofisticados: fermentação em leito fixo, tambor rotativo, câmaras de aço inoxidável automatizadas, ou bandejas com microsistemas, como sensores eletrônicos e serviços mecânicos de carga e descarga (RAIMBAULT, 1997).

Idêntico progresso tecnológico no ramo da fermentação semi-sólida não foi presenciado pelos países ocidentais e europeus. O sistema de fermentação semi-sólida nesses países foi abandonado por volta de 1940, quando a descoberta da penicilina direcionou as pesquisas para o desenvolvimento da fermentação submersa (NIGAN, SINGH, 1994). Esta situação tem mudado nos últimos dez anos, com o ressurgimento do crescente interesse da fermentação semi-sólida em todo o mundo (MURTHY *et al.*, 1993). Este fato pode estar ligado ao baixo crescimento das indústrias fermentativas nos países ocidentais e europeus quando comparado com o crescente avanço tecnológico no Japão. Uma análise crítica desses fatos históricos mostram hoje



um conhecimento melhor dos processos fermentativos e um reconhecimento da importância da umidade ótima do meio, até no caso de fermentações bacterianas, indicando que as decisões tomadas em 1940 pelos países ocidentais, ignorando o sistema de fermentação semi-sólida, provavelmente não foram as mais apropriadas (NIGAN, SINGH, 1994; LONSANE *et al.*, 1992). Assim, a produção de ácidos orgânicos (KUMAR, LONSANE, 1998; PALLARES *et al.*, 1996), antibióticos, bioinseticidas (RAIMBAULT, 1997), bem como uma grande variedade de enzimas (KUMARAN *et al.*, 1997; CHATTERJEE *et al.*, 1996; HALTRICH *et al.*, 1996) são alguns exemplos de produtos de interesse industrial que têm sido estudados aplicando-se a tecnologia de fermentação de substratos sólidos. Além disso, a fermentação semi-sólida apresenta grande potencial de aplicação na produção de alimentos ricos em proteínas para consumo humano e animal. Substratos amiláceos fermentados, com alto valor nutricional, podem ajudar a combater a deficiência protéica, principal causa de desnutrição em seres humanos. Substratos lignocelulósicos fermentados podem servir de alimento para ruminantes, aumentando a digestibilidade das fibras nesses animais (RAIMBAULT, 1997).

Qualquer que seja o produto de interesse, para que o desenvolvimento do processo de fermentação semi-sólida seja satisfatório, tal como na fermentação submersa, existe uma série de variáveis ambientais que precisam ser controladas, dentro de limites compatíveis com as características do processo.

## 2.2 - CONTROLE DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO

Condições ambientais como temperatura, umidade, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento e a formação de produto. Em cultivos submersos, o controle ambiental é relativamente simples, tendo em vista a

homogeneidade da suspensão das células microbianas e da solução de nutrientes e produtos na fase líquida.

O baixo conteúdo de umidade em cultivos semi-sólidos, permite um menor volume de reator por massa de substrato a ser utilizada no cultivo microbiano em relação ao cultivo submerso, e também uma recuperação do produto numa forma mais concentrada. Sérios problemas, no entanto, são encontrados no que diz respeito à mistura, troca de calor, transferência de oxigênio, controle de umidade, gradientes de pH e distribuição de nutrientes como consequência da heterogeneidade do sistema de cultivo. Esta última característica da fermentação semi-sólida traz dificuldades ao controle e às medidas das variáveis acima mencionadas, torna-as trabalhosas e muitas vezes inexatas, limitando o potencial de aplicação desta tecnologia (RAIMBAULT, 1997). Devido a estes problemas, os microrganismos que têm sido selecionados para fermentação semi-sólida são mais tolerantes a uma ampla faixa de condições de cultivo (MUDGETT, 1986).

### 2.2.1 • UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA

De acordo com a definição, o processo de fermentação semi-sólida refere-se ao crescimento microbiano em partículas sólidas na ausência de água livre (MITCHELL, LONSANE, 1992; PANDEY, 1992). A água presente no sistema fermentativo existe na forma complexada dentro da matriz sólida ou como uma fina camada absorvida na superfície das partículas, ou ainda, ligada intensamente dentro da região de capilaridade do sólido. Água livre somente poderia ocorrer uma vez excedida a capacidade de saturação da matriz sólida (NIGAN, SINGH, 1994).

O nível de umidade no qual a água livre torna-se evidente varia consideravelmente entre os substratos, dependendo, principalmente, de seu poder de absorção. Por exemplo, água livre pode ser observada quando o

conteúdo de umidade em arroz excede 50-55%. Já em substratos lignocelulósicos, água livre torna-se evidente ao redor de 80% de umidade (PRIOR *et al.*, 1992).

O teor de umidade em processos semi-sólidos geralmente varia entre 30 e 85%. O cultivo de microrganismos a um alto nível de umidade leva a uma compactação dos sólidos. Além disso, os espaços entre as partículas são ocupados pela água, dificultando as trocas gasosas e tornando o substrato mais vulnerável à contaminação bacteriana. Por outro lado, substratos sólidos com baixo nível de umidade levam a uma diminuição no crescimento microbiano, baixa acessibilidade aos nutrientes e uma gradativa redução da formação de produto de interesse (LONSANE *et al.*, 1985).

O nível ótimo de umidade para crescimento de microrganismos em processos semi-sólidos é altamente dependente da capacidade que o substrato tem de ligar-se à água. Por exemplo, a umidade ótima para o crescimento de *Aspergillus niger* em arroz foi de 40%, enquanto que em polpa de café, a umidade ótima foi de 80% (HALTRICH *et al.*, 1996). Isto mostra que a umidade não é uma variável que permite anteciper o crescimento de um microrganismo. Geralmente, admite-se que a água necessária ao desenvolvimento de um microrganismo pode ser definida em termos de atividade de água ( $A_w$ ) do ambiente, ao contrário do conteúdo de umidade do substrato sólido. Este parâmetro é definido como a razão da pressão de vapor da água no substrato ( $p$ ) pela pressão de vapor da água pura ( $P_0$ ) numa mesma temperatura, isto é:  $A_w = p/p_0$ . Este conceito pode ser relacionado a outros parâmetros, tais como umidade relativa (% UR =  $100 \times A_w$ ) e potencial de água ( $\psi = R T V \ln A_w$ ) onde R é a constante do gás ideal, T é a temperatura absoluta e V é o volume molar da água (PANDEY, 1992).

A água tem um valor de  $A_w$  igual a um, e este valor pode diminuir com a adição de solutos. Bactérias crescem, principalmente, a altos valores de  $A_w$ , enquanto que os fungos e algumas leveduras podem crescer a baixos

valores de  $A_w$  (PANDEY, 1992), tornando a classe fúngica mais adequada ao processo de fermentação semi-sólida (RAIMBAULT, 1997).

A redução de  $A_w$  tem um marcante efeito no crescimento microbiano. Tipicamente, a redução na  $A_w$  estende a fase lag e diminui a velocidade específica de crescimento, resultando numa baixa quantidade de biomassa produzida, como mostrado na FIGURA 1.

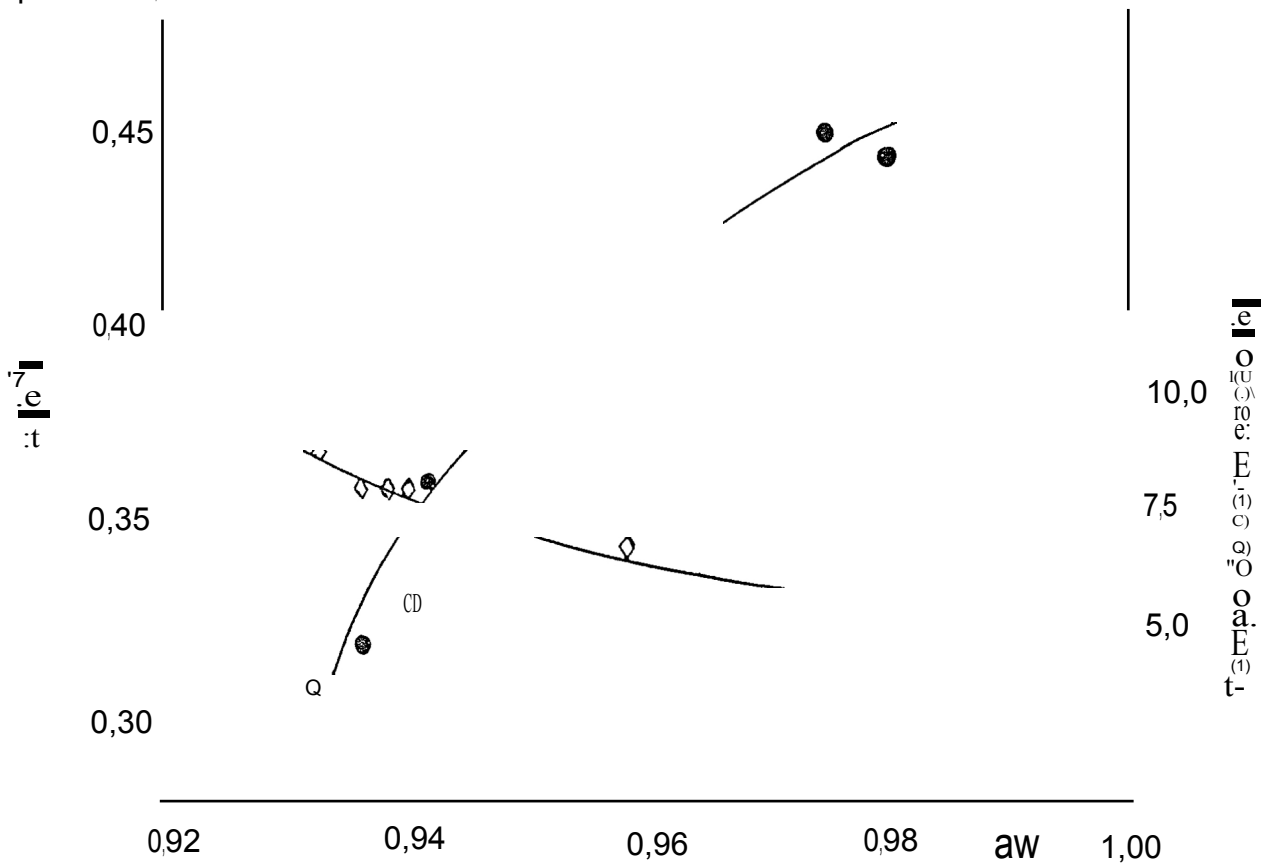


FIGURA 1 - Evolução da velocidade específica de crescimento  $\langle \mu \rangle$  e do tempo de germinação  $(t)$  em função da atividade de água inicial do meio (Adaptado de RAIMBAULT, 1997).

Existem registros na literatura que o valor de  $A_w$  ótimo para crescimento de um número restrito de fungos usados em fermentação semi-sólida foi pelo menos 0,96, enquanto que o valor mínimo de  $A_w$  para crescimento da maioria desses fungos foi maior que 0,90. Os valores de  $A_w$  ótimos para esporulação de *Trichoderma viride* e *Penicillium roqueforti* foram

mais baixos do que para o crescimento. Estas pesquisas sugerem que, mantendo-se  $A_w$  num valor ótimo para o crescimento poderia-se permitir a formação de biomassa fúngica sem esporulação (RAIMBAULT, 1997).

### 2.2.2 - TEMPERATURA E TRANSFERÊNCIA DE CALOR

Durante a fermentação semi-sólida, em geral, uma quantidade relativamente grande de calor está envolvida, a qual está diretamente relacionada com a atividade metabólica do microrganismo. Nos estágios iniciais da fermentação, a temperatura e a concentração do oxigênio são as mesmas em todos os locais do meio semi-sólido. A medida que a fermentação progride, o oxigênio difunde-se e submete-se a várias reações, liberando calor, o qual não é facilmente dissipado devido à pobre condutividade do substrato. Com o progresso da fermentação, ocorre uma redução do substrato e uma diminuição da porosidade, dificultando ainda mais a transferência de calor. Sob estas circunstâncias, gradientes de temperatura são desenvolvidos nos sistemas de fermentação semi-sólida. No caso de compostagem, os gradientes de temperatura podem ser muito mais acentuados quando a transferência de calor é muito baixa, e a temperatura pode elevar-se até acima de 70°C (MURTHY, 1993).

A transferência de calor em fermentações semi-sólidas está associada com a atividade metabólica do microrganismo, bem como com a aeração do sistema fermentativo. A temperatura do substrato é muito crítica em fermentações desta natureza. Altas temperaturas afetam a germinação de esporos, o crescimento celular e a formação de produtos (LONSANE *et al.*, 1985), enquanto que baixas temperaturas não são favoráveis ao crescimento de microrganismos e a outras reações bioquímicas (THIEMANN, 1985). O baixo teor de umidade e a baixa condutividade do substrato são características que tornam difícil uma boa transferência de calor em sistemas semi-sólidos. A dificuldade de dissipação do calor é uma das principais desvantagens da

fermentação semi-sólida em comparação com a fermentação submersa, onde uma boa mistura promove uma dissipação eficiente do oxigênio e também serve para melhorar o controle da temperatura (MURTHY, 1993).

A técnica convencional usada para controle da temperatura em fermentações submersas não é facilmente adaptada para os sistemas de fermentação semi-sólida. Isto torna o controle da temperatura em cultivos semi-sólidos mais difícil. O controle da temperatura em fermentações semi-sólidas pode ser realizado pelo ajuste da velocidade de aeração do sistema. Se a temperatura é muito baixa, quando diminui-se a velocidade de aeração, permite-se um aumento na temperatura devido à respiração do microrganismo. Porém, deve-se tomar bastante cuidado para evitar que a concentração de oxigênio torne-se crítica, o que poderia afetar a atividade metabólica das células. Por outro lado, se a temperatura do substrato é alta, um aumento na velocidade de aeração promove um resfriamento no sistema fermentativo, pois o calor pode ser arrastado pelo ar para fora do sistema. Isto, por sua vez, reduz o teor de umidade do substrato, o que não é favorável ao crescimento do organismo. Para compensar este fato utiliza-se ar parcialmente saturado com umidade na aeração de sistemas de fermentações semi-sólidas (MURTHY, 1993).

### **2.2.3 - SUBSTRATOS**

Substâncias naturais ou sintéticas podem ser utilizadas como substratos em processos de fermentação semi-sólida. Os principais materiais orgânicos disponíveis na natureza são de estrutura polimérica, como por exemplo polissacarídeos (PANDEY, 1992). Os substratos sólidos usados em fermentações semi-sólidas são insolúveis em água e inacessíveis ao ataque direto de microrganismos nos estágios iniciais de crescimento. Em geral, o crescimento microbiano é atribuído à ação de enzimas na quebra de substratos poliméricos para compostos monoméricos, os quais são capazes de permear

através das células microbianas (NANDAKUMAR *et al.*, 1996). Bactérias e leveduras crescem na superfície dos substratos, enquanto que micélios fúngicos penetram dentro das partículas dos substratos (PANDEY, 1992).

A aderência e penetração de microrganismos, bem como a ação de enzimas nos substratos sólidos, dependem de vários fatores físicos e químicos. Entre os fatores físicos, a acessibilidade do microrganismo ao substrato, o efeito de filme e o efeito da massa, são importantes. A morfologia química, especialmente a porosidade e o tamanho das partículas do substrato, governam a área superficial acessível ao organismo. Entre os fatores químicos, a natureza química do substrato (grau de polimerização e cristalização) são critérios importantes (NANDAKUMAR *et al.*, 1996; PANDEY, 1992).

O pré-tratamento do substrato sólido por meios mecânicos ou químicos algumas vezes faz-se necessário. A finalidade destes pré-tratamentos é melhorar as características físicas e químicas do substrato como: o aumento da superfície de contato, a permeabilidade, a porosidade, etc., visando facilitar o crescimento microbiano. Os pré-tratamentos de diversos tipos de substratos podem ser brandos ou drásticos, e incluem tratamento com vapor, vários tipos de moagem, trituração, tratamento com ácidos ou álcali, etc. (LONSANE *et al.*, 1985).

Qualquer que seja a composição do substrato utilizado na fermentação semi-sólida, a porosidade do mesmo é uma característica fundamental para garantir uma eficiente circulação de oxigênio pelos espaços intersticiais, garantindo assim, um desenvolvimento micelial também no interior da massa e não somente na sua superfície (THIEMANN, 1985).

#### 2.2.4- PH

Apesar do controle do pH do meio ser uma variável crítica para o sucesso das fermentações, tanto submersas como semi-sólidas, normalmente o mesmo não é controlado e corrigido durante o andamento do processo de fermentação semi-sólida. Condições técnicas impedem de efetuar este controle durante o andamento da fermentação, pela impossibilidade de se obter uma adequada homogeneização do material (THIEMANN, 1985).

A capacidade tamponante de alguns substratos, juntamente com a umidificação dos mesmos com soluções de pH controlado, ajudam a eliminar a necessidade do controle do pH durante a fermentação. Este benefício é, portanto, explorado no ajuste inicial do pH dos sólidos na faixa de 4,5-5,9 durante a umidificação ao nível desejado de pH (THIEMANN, 1985). Outro modo de evitar a acidificação da massa fermentada, quando sais de amônio são usados como fonte de nitrogênio, é a adição de uréia ao meio. A hidrólise da uréia libera amônia, que neutraliza rapidamente a acidez, formando íons amônio. Porém, mudanças locais de pH em aglomerados, formados quando o organismo desenvolve-se na forma de filme nos sólidos, não podem ser impedidas e resultam em baixa produtividade em fermentadores não agitados (LONSANE *et al.*, 1985).

#### 2.2.5 - AERAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

A quase totalidade dos processos fermentativos semi-sólidos são de natureza altamente aeróbia, necessitando, portanto, da presença de oxigênio (THIEMANN, 1985).

A aeração do meio fermentativo em fermentadores laboratoriais ou fermentadores de grande escala é realizada pela aeração forçada de ar estéril sob pressão. As velocidades de aeração são governadas pela natureza do microrganismo usado, necessidade de oxigênio requerido para síntese de produto, quantidade de calor metabólico a ser dissipado, espessura da camada



de substrato empregada, grau com que o CO<sub>2</sub> e outros metabólitos voláteis precisam ser eliminados e grau de espaços de ar disponíveis no substrato (LONSANE *et al.*, 1985).

A fração vazia do meio semi-sólido, definida como fração de volume que é ocupado pelo ar entre as partículas de substrato, é uma função do substrato e de seu conteúdo de umidade. Se a fração vazia é suficientemente grande, a mistura contínua e a aeração do meio quase não são necessários, pois os espaços podem conter oxigênio suficiente para o crescimento e metabolismo microbiano (WEILAND, 1988).

Alguns procedimentos operacionais podem ser utilizados visando o aumento do livre movimento do ar pela massa semi-sólida, favorecendo, por conseguinte, a transferência de oxigênio. Estes procedimentos são: emprego de substrato poroso, grossamente granulado ou fibroso; redução da espessura do substrato; aumento dos espaços intersticiais; emprego de bandejas perfuradas; agitação do substrato; emprego de fermentador rotativo (LONSANE *et al.*, 1985).

### **2.2.6 - AGITAÇÃO**

Nas fermentações semi-sólidas a agitação, quando utilizada, exerce múltiplas finalidades: homogeneização do material; eliminação de agregados; aeração da massa; melhora na troca de calor e distribuição uniforme de inóculo (LONSANE *et al.*, 1985).

A intensidade de agitação do material semi-sólido depende de uma série de fatores, sendo influenciada pela natureza do microrganismo, suas exigências respiratórias, quantidade de calor gerado e que deve ser dissipado, espessura da camada de substrato, eliminação do CO<sub>2</sub> formado, etc. Devido à natureza frágil da parede celular da maioria dos fungos e da natureza quase sempre abrasiva do material semi-sólido, a movimentação da massa em

fermentação é, geralmente, do tipo descontínua, lenta e de curta duração. A agitação periódica do substrato aumenta também a disponibilidade do oxigênio, mas uma agitação excessiva pode ser prejudicial, por diminuir a porosidade do material e danificar o micélio (THIEMANN, 1985).

### 2.3 - FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA X FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Uma generalização das vantagens relacionadas aos processos submersos ou em meio semi-sólido é bastante difícil, uma vez que é conhecido o fato de que uma dada cepa de microrganismo pode melhor adequar-se a um ou a outro processo de fermentação e produzir complexos enzimáticos diferentes (MAIORANO, 1990). Entretanto, podemos citar, a título de ilustração, as seguintes diferenças básicas entre os dois processos:

- o custo dos equipamentos e o custo de manutenção dos mesmos, é mais elevado para os processos submersos.
- o consumo de energia elétrica, devido a aeração e agitação, em fermentações submersas é muito maior que fermentações em meio semi-sólido.
- o produto da fermentação em meio semi-sólido é obtido na forma concentrada, necessitando em muitos casos, somente de uma rápida secagem para ser comercializado. Por outro lado, o produto do processo submerso precisa sofrer várias operações antes de ser comercializado.
- no processo semi-sólido o meio de cultivo é bastante simples, sendo geralmente constituído de cereais e/ou resíduos da indústria de processamento de cereais, mais água.
- no processo semi-sólido são requeridos teores relativamente baixos de umidade do meio de cultivo para o crescimento de microrganismos. Isso

praticamente elimina o problema de contaminação por bactérias, facilitando, desta maneira, o controle desses contaminantes.

- no processo semi-sólido é bastante difícil a manutenção das condições ótimas de crescimento, dada a dificuldade de controlar e medir a umidade do meio, pH, oxigênio, gás carbônico e temperatura.
- são necessárias quantidades relativamente grandes de inóculo para o processo em meio semi-sólido.
- o processo em meio semi-sólido geralmente requer considerável mão de obra.

#### **2.4 - Uso DE REATORES PARA FERMENTAÇÕES SEMI-SÓLIDAS**

Com o advento da indústria fermentativa, têm aumentado notavelmente o interesse por diferentes geometrias e tipos de fermentadores, acoplados a sofisticados computadores que auxiliam no controle dos processos das fermentações submersas. Esta, no entanto, não é a realidade verificada no caso de fermentações semi-sólidas nos países ocidentais, onde somente desenvolvimentos limitados têm sido apresentados, no que diz respeito a geometria do reator, otimização do processo e ao controle dos sistemas (PANDEY, 1996). Isto explica porque muitas pesquisas realizadas em escala laboratorial não estão sendo ampliadas para o nível industrial.

O desenvolvimento de novos instrumentos e estratégias de controle, específicos para processos semi-sólidos, simplificariam o escalonamento, fazendo com que a tecnologia de fermentação semi-sólida em reatores torne-se economicamente competitiva (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996). Estudos ainda precisam ser realizados objetivando-se suprir as dificuldades encontradas quanto ao desenvolvimento de reatores bem adaptados ao processo de fermentação semi-sólida, ampliação da produção ao nível industrial e, para

algumas aplicações específicas, como na utilização de fungos, que apresentam baixa velocidade de crescimento, vencer a dificuldade de manter condições assépticas durante o processo de cultivo (BANDELIER *et al.*, 1997).

Atualmente, existem no mercado vários reatores semi-sólidos industriais e pilotos, os quais, no entanto, apresentam várias limitações. Por exemplo, a "Fujiwara Company" (indústria japonesa) desenvolveu alguns reatores semi-sólidos industriais, mas que são de alto custo, funcionam sob condições não totalmente assépticas e apresentam aplicação específica para produção de enzimas ou molho de soja. Na "Dijon" (indústria francesa), um reator semi-sólido piloto de múltiplas aplicações, com capacidade para 1000 Kg foi desenvolvido. No entanto, tal reator não opera assepticamente, limitando sua aplicabilidade (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996).

Em escala piloto, BANDELIER *et al.* (1997) estudaram a aplicação de um reator vertical, na forma cilíndrica, com capacidade para 50 Kg e possibilidade de agitação planetária projetada para mistura, visando a produção de ácido giberélico, sob condições assépticas. Estudos também estão sendo realizados por FERNÁNDEZ *et al.* (1996) visando operar sob condições assépticas um biorreator de múltipla aplicação.

Em larga escala, fermentações semi-sólidas são efetuadas, principalmente, em três tipos de biorreatores: fermentador do tipo bandeja, fermentador de leito fixo, ou leito empacotado e fermentador do tipo tambor rotativo (MURTHY, 1993). Existem ainda outros tipos de biorreatores descritos na literatura, como fermentadores em esteiras rolantes e o reator de leito fluidizado (CROOKE *et al.*, 1991).

O reator de leito fixo, também conhecido como reator de leito empacotado ou em coluna, tem recebido uma maior atenção nos últimos anos. A principal vantagem no uso deste tipo de reator é a dissipação do oxigênio no meio, através da aeração forçada (MURTHY, 1993). Além disso, o CO<sub>2</sub>

produzido durante as biarreações pode ser eliminado do meio, substituído pelo ar, melhorando o fornecimento de oxigênio para o microrganismo.

Fermentador de leito fixo consiste de uma coluna de vidro ou de plástico, a qual apresenta numa das extremidades uma entrada para aeração, e na outra, uma saída para exaustão dos gases do meio. A temperatura nesse tipo de reator, em escala de bancada, pode ser controlada através da passagem de água, se a coluna for encamisada, ou submetendo-se a mesma a um banho termostatizado. A umidade do meio pode ser controlada usando ar úmido na entrada do reator (LONSANE *et al.*, 1985).

Diversos produtos de interesse têm tido sua produção estudada utilizando este tipo de reator. PANDEY *et al.* (1996) estudaram a produção de glicoamilase por *Aspergillus niger*, e os resultados foram muito promissores: a quantidade de enzima produzida no reator de leito fixo foi 50% maior que em frascos Erlenmeyer. Ácido cítrico é outro produto de interesse que tem tido sua produção pesquisada em reator de leito fixo (LU *et al.*, 1998). A produção de enzimas em reatores semi-sólidos de leito fixo também estão sendo bastante investigadas. BABU & SATYANARAYANA (1995) estudaram a produção de  $\alpha$ -amilase em frasco Erlenmeyer, fermentador do tipo bandeja e em reator de leito fixo. A produção da enzima foi maior no reator de leito fixo que em Erlenmeyer ou bandeja, provavelmente porque a aeração foi melhor e a área superficial maior. A xilanase é outra enzima de grande interesse industrial cuja produção vem sendo estudada em reator de leito fixo. ARCHANA & SATYANARAYANA (1997) compararam a produção de xilanase em frascos e em reatores do tipo bandeja e coluna e obtiveram melhores resultados no reator em coluna, provavelmente devido à eficiência da aeração.

## 2.5 - ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

O grande interesse na produção de enzimas pelo processo de fermentação semi-sólida está relacionada à elevada atividade enzimática que as enzimas produzidas por esta técnica apresentam, quando comparadas com a fermentação submersa (NIGAN, SINGH, 1994).

A produção de diversas enzimas pelo processo de fermentação em meio semi-sólido tem sido estudada por vários autores, utilizando diferentes tipos de substratos, bem como uma grande variedade de microrganismos, como mostrado na TABELA 1.

TABELA 1 - Enzimas obtidas por fermentação em substratos sólidos.

Enzima	Microrganismo	Substrato	Referência
Tanase	<i>Aspergillus oryzae</i>	farelo de trigo	CHATTERJEE <i>et al.</i> , 1996
β-glicosidase	<i>Aspergillus phoenicis</i>	polpa de beterraba	DESCHAMPS, HUET, 1984
Celulase	<i>Sporotrichum cellulophilum</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	farelo de trigo	KIM <i>et al.</i> , 1985
Xilanase	<i>Chaetomium globosum</i> e <i>Aspergillus niger</i>	farelo de trigo	WIACEK-ZYCHILINSKA <i>et al.</i> , 1994
Arabinofuranosidase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	polpa de beterraba	ROCHE <i>et al.</i> , 1994
β-galactosidase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	grãos de milho	BECERRA, SISO, 1996
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	bagaço de cana-de-açúcar	SOUS-PEREIRA <i>et al.</i> , 1996
Pectinase Celulase Xilanase Amilase	<i>Thermonospora curvata</i>	bagaço de cana-de-açúcar	STUTZENBERGE, 1994
Glicerol oxidase	<i>Penicillium se</i>	farelo de milho	LIN <i>et al.</i> , 1996
Amiloglicosidase	<i>Aspergillus niger</i>	farelo de trigo	RAMADAS <i>et al.</i> , 1996
Glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	farelo de trigo e farinha de milho	PANDEY <i>et al.</i> , 1996

## 2.6 - XILANASES OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO

Uma recente revisão bibliográfica revelou que a produção da enzima xilanase pelo cultivo de microrganismos em substratos sólidos vêm sendo bastante estudada por vários grupos de pesquisas, tanto em frascos Erlenmeyer como em biorreatores (HALTRICH *et al.*, 1996).

WIACEK-ZYCHILINSKA *et al.* (1994) estudaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção de xilanases de *Chaetomium globosum* e *Aspergillus niger* por fermentação semi-sólida, tanto em escala piloto como em escala laboratorial. Os experimentos em escala piloto foram efetuados em um fermentador contendo cinco bandejas, com capacidade para 2,5 Kg de meio cada. As melhores atividades xilanolíticas foram obtidas pelo crescimento dos microrganismos em uma mistura de farelo de trigo e polpas de maçã e beterraba. Neste meio, *C. globosum* produziu 17,5 e 20,0 U/ml de atividade de xilanases extraídas de meios sólidos (escalas de laboratório e piloto, respectivamente).

A produção de xilanase por fermentação semi-sólida utilizando vários materiais lignocelulósicos como fonte de carbono foi estudada por ALAM *et al.* (1994). Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Thermomyces lanuginosus* e *T. aurantiacus*, cultivados a 55°C durante 7 dias, com a umidade inicial do meio ajustada em 50%. As maiores atividades de xilanases foram produzidas quando utilizou-se como substrato o farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar. *T. lanuginosus* apresentou atividade enzimática de 1843,6 U/g e 824,5 U/g de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, enquanto que para *T. aurantiacus* os resultados correspondentes foram 542,5 U/g e 292,6 U/g.

O efeito da composição do meio na produção de xilanase por *T. lanuginosus* também foi estudado por PURKARTHOFER *et al.*, (1993), tanto em meio líquido como em meio semi-sólido, utilizando a técnica de planejamento experimental. O meio usado para a máxima produção de xilanase (31,2 g/L de espiga de milho, 30,2g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>) produziu 36160 nkat/ml com 7 dias de cultivo. Já a otimização da produção em meio semi-sólido utilizando espiga de milho, a 70% de umidade, suplementada com 1,75% de extrato de levedura rendeu 125000 nkat/ml de atividade de xilanase (336700 nkat/g de sólidos secos) com 9 dias de cultivo.



A produção de xilanases pelo fungo termofílico *Melanocarpus albomyces* em cultivos submersos e semi-sólidos foi pesquisada por JAIN (1995), que utilizou vários resíduos agro-industriais como substratos pré-tratados com ácido, base ou sem pré-tratamento. A produção da enzima foi mais alta em cultivos semi-sólidos que em submersos. Quando utilizou-se os substratos sem qualquer pré-tratamento, os melhores resultados (756 e 667 U/g) foram obtidos com farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. As melhores atividades de xilanase, no entanto, foram obtidas quando utilizou-se farelo de arroz (1084 U/g) e casca de arroz (819 U/g), submetidos a um pré-tratamento onde parte da holocelulose foi removida.

Uma xilanase de *Melanocarpus albomyces* IIS-68, obtida por fermentação semi-sólida de bagaço de cana-de-açúcar foi purificada e caracterizada por JAIN *et al.* (1998). A massa molar da xilanase purificada foi 23500 e 30000 Da., determinadas por SDS-PAGE e filtração em gel, respectivamente. Os valores de KM para xilanases provenientes de "oat spelts", "larchwood" e "birchwood" foram 12,5, 14,3 e 13,2, respectivamente. A enzima purificada mostrou atividade máxima a 70°C e foi estável por até 2 horas nesta temperatura. A xilanase foi estável na faixa de pH 5,5-9,5 e mais de 50% da atividade foi mantida no pH 10.

## 2.7 - XILANASES DE *Thermoascus aurantiacus*

A aplicação de microrganismos termófilos na produção de enzimas termoestáveis tem várias vantagens técnicas e econômicas (ZENTGRAF, 1992; SONNLEITNER, FIECHTER, 1983). O fungo termófilo *T. aurantiacus* é uma fonte próspera de enzimas altamente termoestáveis, como xilanases (KALOGERIS *et al.*, 1998; ALAM *et al.*, 1994; KHANDKE *et al.*, 1989; GRAJEK, 1987; TAN *et al.*, 1987; YU *et al.*, 1987), arabinofuranosidase (ROCHE *et al.*, 1994),  $\beta$ -glucosidase, endocelulase e exocelulase (KHANDKE *et al.*, 1989).

Recentemente, ADANS (1992) constatou a presença de pequenas quantidades de amilase extracelular no meio de crescimento de *T. aurantiacus*, o qual não havia sido anteriormente citado como produtor de amilase.

*T. aurantiacus*, fungo pertencente ao grupo dos termófilos, é um ascomiceto que foi isolado pela primeira vez em 1907 por Hugo Miehe, a partir de pilhas de feno auto aquecidas, armazenadas em depósitos. A presença deste fungo foi constatada em diversos meios, como plantas de tabaco, solo, cavacos de madeira, vagem de cacau, esterco de aves, efluentes, etc. (MACHUCA, 1991).

Diversos trabalhos informam sobre a capacidade de produção de xilanases por *T. aurantiacus* utilizando uma variedade de substratos sólidos como meio de cultivo. Algumas pesquisas têm sido direcionadas para o aumento da produtividade através da otimização das condições de cultivo, bem como para a purificação, isolamento e caracterização da enzima.

O cultivo de *T. aurantiacus* em farelo de trigo visando a produção de uma endo-1-4-f3-D-xilanase extracelular foi estudado por GOMES *et ai.* (1994). A xilanase obtida mostrou atividade ótima à pH 5,0 e 80°C e excepcional estabilidade térmica (50-70°C). À 70°C a meia vida da enzima foi de 204 horas.

ALAM *et ai.* (1994) cultivaram *T. aurantiacus* em meio semi-sólido contendo farelo de trigo. A xilanase produzida foi estável na faixa de pH 5,0-11,0. A enzima permaneceu ativa após prolongados períodos de estocagem. À 4°C não houve perda de atividade após 1 mês de estocagem, e 90% da atividade de xilanase foi mantida após 10 dias à 55°C.

GRAJEK (1987) estudou a produção de xilanases por vários fungos termófilos usando diferentes métodos de cultivo. Os resultados obtidos mostraram que *Humicola lanuginosa* (18,72 U/ml) e *Sporotrichum thermophile* (15,01 U/ml) foram os melhores produtores em cultivo submerso, enquanto que *T. aurantiacus* (9,67 U/ml) e *H. lanuginosa* (7,26 U/ml) foram os melhores

produtores de xilanases em fermentação semi-sólida. A xilanase de *T. aurantiacus* destacou-se pela alta termoestabilidade à 65-70°C e temperatura ótima de 75°C.

A xilanase termoestável purificada do fungo *T. aurantiacus* pot TAN *et ai.* (1987) mostrou atividade completa após 24 horas à 70°C e 97 horas à 60°C. A meia vida foi de 54 minutos à 80°C. Além disso, num estudo envolvendo vinte e uma cepas de fungos termofílicos da coleção de cultura de Forintek, a cepa de *T. aurantiacus* A 436 foi selecionada como a melhor produtora de xilanase, vindo em segundo a cepa de *T. aurantiacus* C 412, sendo que as duas produziram quantidades de enzima muito além da capacidade produtora dos outros fungos (YU *et ai.*, 1987).

Recentemente, KALOGERIS *et ai.* (1988) publicaram resultados da produção de xilanases de *T. aurantiacus* por fermentação semi-sólida de farelo de trigo. Uma elevada atividade enzimática foi obtida (6193 U/g) após 7 dias de cultivo à 50°C. Duas xilanases foram purificadas e caracterizadas, as xilanases I e II, apresentando pI de 6,8 e 5,5, respectivamente. As duas formas enzimáticas foram ativas em pH 4,0-4,5 e 70-75°C. Aproximadamente 58 e 35% da atividade máxima foi conservada à 85°C para a xilanase I e II, respectivamente. Incubações à 25°C por 24 horas em pH 3,0 revelaram que quase toda atividade foi mantida para a xilanase I entre pH 4-5, enquanto que a xilanase II mostrou estabilidade similar em pH 8-9. As duas enzimas mostraram boa estabilidade à 80°C, exibindo meia vida de 88 e 41 minutos, respectivamente.

### 3 - OBJETIVOS

Considerando o grande interesse no estudo das xilanases fúngicas em função de sua aplicabilidade nos processos industriais de bioconversão e biobranqueamento da polpa de celulose, a alta atividade e termoestabilidade desta enzima presente em fungos termofílicos, aliados à possibilidade de uma maior produção em cultivos semi-sólidos, propôs-se estudar a produção xilanase por *Thermoascus aurantiacus* utilizando a técnica de fermentação semi-sólida, e selecionar as variáveis que conduzem à maior produção dessa enzima.

Os objetivos específicos desse estudo, desenvolvidos em ordem cronológica, foram:

#### PARTE I - Produção de atividade de xilanase por *T. aurantiacus*.

- Efeito do tipo e concentração do substrato;
- Extração da xilanase;
- Determinação do crescimento de *T. aurantiacus*;
- Efeito da massa de bagaço de cana-de-açúcar;
- Efeito da granulometria do bagaço.

#### PARTE II - Otimização da produção de xilanase em Erlenmeyer.

- 1ª Fase do planejamento - Fatorial fracionado 2<sup>4-1</sup>;
- 2ª Fase do planejamento - Passo ascendente;
- 3ª Fase do planejamento - Planejamento estrela.

#### PARTE III - Produção de xilanase em reator de leito fixo.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a cepa brasileira do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, pertencente à classe dos ascomicetos, isolado de pilhas de cavacos de *Eucalyptus* sp., na indústria Champion Papel e Celulose Ltda., em Mogi Guaçu, SP (AUER, 1986).

### 4.2 - SUBSTRATOS

Os substratos utilizados foram:

a) farelo de trigo comercial;

b) bagaço de cana-de-açúcar "in natura", proveniente da Usina Nova América S/A (Tarumã, SP), previamente seco à 30°C e moído à 20, 10 ou 7 mesh.

### 4.3 - MEIOS DE CULTURA

#### 4.3.1 - Meio de Manutenção do Fungo

O meio de cultura usado para obtenção de ascosporos de *T. aurantiacus* foi composto por 2% de glicose, 2% de ágar-ágar e 23% (v/v) de infuso de batata, autoclavado por 10 minutos a 121°C.

#### 4.3.2 - Meio Básico

O meio de cultura básico usado nas fermentações foi constituído por uma fonte de carbono (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar ou glicose) e solução mineral (VOGEL, 1956). As concentrações dos substratos e da solução salina variaram conforme o experimento. Cada mililitro da solução mineral continha citrato de sódio dihidratado (0,1259), fosfato monobásico de potássio (0,259), nitrato de amônio (0,19), cloreto de cálcio dihidratado (0,059), ácido cítrico (0,25mg), sulfato de zinco heptahidratado (0,25mg), sulfato ferroso amoniacal pentahidratado (0,05 mg), sulfato de cobre pentahidratado (0,015 mg) e sulfato de manganês dihidratado (0,002 mg).

### 4.4 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

A determinação da curva de crescimento do fungo *T. aurantiacus* foi feita em meio líquido contendo glicose (2%) e solução mineral de Vogel (2% v/v). O crescimento foi acompanhado através da medida da massa seca. Os conteúdos dos frascos Erlenmeyers inoculados, incubados à 45°C por um período de tempo que variou de 1 à 10 dias, foram filtrados a vácuo sobre papel de filtro seco e de massa conhecida. Após vigorosa lavagem, com aproximadamente 1 litro de água destilada, a massa celular foi determinada por secagem em balança de infravermelho, a 60°C, até massa constante.

#### 4.5 - CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE XILANASE EM ERLLENMEYER

Todos os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 300 mL. Nas fermentações utilizando substratos sólidos, os mesmos foram autoclavados, separadamente, à 121°C por 1 hora. A solução mineral autoclavada à 121°C por 10 minutos foi acrescida ao substrato e a umidade inicial desejada foi ajustada com o acréscimo de água. Após inoculação, os frascos foram colocados dentro de sacos plásticos contendo pequenos furos, a fim de minimizar a perda de umidade do meio, devido à elevada temperatura de cultivo (YU *et al.*, 1987). Os frascos foram mantidos em condições estáticas em estufa úmida, à temperatura de 45°C.

#### 4.6 - EXTRAÇÃO DA ENZIMA

Após o período de incubação, os conteúdos dos Erlenmeyers contendo os meios fermentados foram acrescidos de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, na proporção 1:6,7 (1 g seca de substrato: 6,7 ml de tampão). Os frascos foram agitados à 60 rpm durante 1 hora, à temperatura ambiente. Os sólidos foram separados por filtração à vácuo e a extração repetida até 3 vezes.

Num experimento foi realizada a extração da enzima a quente, ou seja, após a adição do tampão, os frascos foram submetidos a agitação (60 rpm) durante 1 hora, na temperatura de 50°C.

Para os ensaios em reator, a extração da enzima foi realizada analogamente aos ensaios anteriores, após transferir todo o conteúdo da coluna para frascos Erlenmeyers.

## 4.7 - ANÁLISES

### 4.7.1 - Umidade Final

Após o término dos cultivos semi-sólidos a umidade final do meio foi determinada por análise de massa seca, utilizando secagem em balança de infravermelho à 80°C até massa constante.

### 4.7.2 -Atividade Enzimática

A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana, de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Definiu-se como uma unidade de atividade enzimática, a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor, expresso como xilose, por minuto, a 50°C.

### 4.7.3 - Medida do Crescimento de *T. aurantiacus* em Bagaço de Cana-de-Açúcar

A estimativa do crescimento celular do fungo no meio semi-sólido foi realizada determinando-se o conteúdo de nitrogênio incorporado, seguindo a metodologia proposta por GRAJEK (1988). Após o cultivo, o meio fermentado foi seco e moído à 20 mesh. Aproximadamente 0,5 g deste material foi lavado exaustivamente com água destilada através de filtração à vácuo utilizando papel de filtro isento de nitrogênio. O conteúdo de proteína do conjunto amostra/papel de filtro foi determinado pelo método de Kjeldahl (SILVA, 1990). Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado com amostra de bagaço



não inoculado com o microrganismo. O conteúdo de proteína do bagaço também foi estimado pelo mesmo método. Conhecendo-se os teores de proteína do fungo, bagaço e do meio fermentado, estimou-se o crescimento celular do microrganismo no meio semi-sólido.

#### 4.7.4 - Teor de Proteína

O conteúdo de proteína do fungo foi estimado pelo método de Kjeldahl, de acordo com SILVA (1990). Este método consiste na mineralização de uma quantidade conhecida de amostra com 3 ml de ácido sulfúrico concentrado, na presença de sulfato de cobre e sulfato de potássio na proporção 2:1 como catalisadores, os quais transformam o nitrogênio orgânico em nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ). A mistura foi aquecida a  $250^\circ\text{C}$  até tornar-se límpida. A amostra mineralizada foi levada ao aparelho de Kjeldahl, onde foi adicionada de hidróxido de sódio 40%, tornando a amostra alcalina e transformando o nitrogênio em gás amônia ( $\text{NH}_3$ ). A amônia foi arrastada por vapor d'água, destilada e recolhida em uma solução de ácido clorídrico 0,01 N padronizada e de volume conhecido, contendo vermelho de metila. O ácido não reagido com a amônia, foi titulado com uma solução de hidróxido de sódio 0,01 N, também padronizada, e por estequiometria, determinou-se o teor de nitrogênio presente na amostra. O teor de proteína na amostra foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

#### 4.8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As melhores condições para obtenção de xilanase em meio semi-sólido foram obtidas aplicando-se a técnica de planejamento experimental. As variáveis selecionadas para o estudo foram: umidade inicial do meio, tempo de cultivo, quantidade de inóculo e massa de substrato.

Para que o número de experimentos não fosse excessivo, foi proposto um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , com o intuito de se fazer uma triagem dos fatores, ou seja, determinar quais fatores exercem maiores efeitos sobre a atividade enzimática. Para cada uma das 4 variáveis, escolheu-se dois níveis a serem investigados, conforme apresentado na TABELA 2. Inicialmente foram feitos 8 experimentos, em duplicata e com repetição. As condições experimentais de cada ensaio foram aquelas da TABELA 3.

TABELA 2 - Fatores e níveis utilizados nos ensaios de cultivo de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido.

Variáveis	nível inferior(-)	nível zero (0)	nível superior(+)
A- Umidade	50%	65%	80%
B -Tempo	10 dias	15 dias	20 dias
C - Inóculo	$10^4$ ascosporos/g	$5 \cdot 10^5$ ascosporos/g	$10^6$ ascosporos/g
D- Massa	5 gramas	10 gramas	15 gramas

TABELA 3 - Matriz para um projeto fatorial  $2^{4-1}$ .

Ensaio	Fatores			
	A	B	C	D
1				
2	+			+
3		+		+
4	+	+		
5			+	+
6	+		+	
7		+	+	
8	+	+	+	+
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Após definição dos fatores mais importantes foi realizado o passo ascendente, visando "caminhar" em direção à resposta ótima mais próxima.

A etapa seguinte foi a realização de novos experimentos na região de máxima produção da atividade de xilanase, a fim de obter um modelo matemático que representasse o processo.

#### 4.9 - OBTENÇÃO DE XILANASE EM REATOR DE LEITO FIXO

Uma representação esquemática do reator de leito fixo utilizado nesse trabalho é mostrado na FIGURA 2. O sistema consiste de uma coluna de vidro encamisada, de 25 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, contendo em um dos lados uma tela de retenção e do outro uma abertura com tampa. Ar umidificado é passado pela coluna através da tela de retenção, e coletado na saída da coluna em um frasco lavador de gases. O sistema foi mantido dentro de um banho termostatizado na temperatura de 45°C, a fim de manter o ar e a entrada da coluna aquecidos.

A cinética de produção de xilanase em reator de leito fixo foi realizada na condição otimizada em Erlenmeyer. A coluna foi preenchida com 17 g de substrato autoclavado à 121°C durante 1 hora, previamente homogeneizado com uma suspensão de esporos ( $10^4$  ascosporos/g de bagaço), 1,7 mL de solução salina (VOGEL, 1956), e água suficiente para ajustar a umidade inicial do meio em 81%. Ar seco, numa vazão de 1,5 L/min., foi aquecido a 45°C e umidificado antes de entrar no reator.

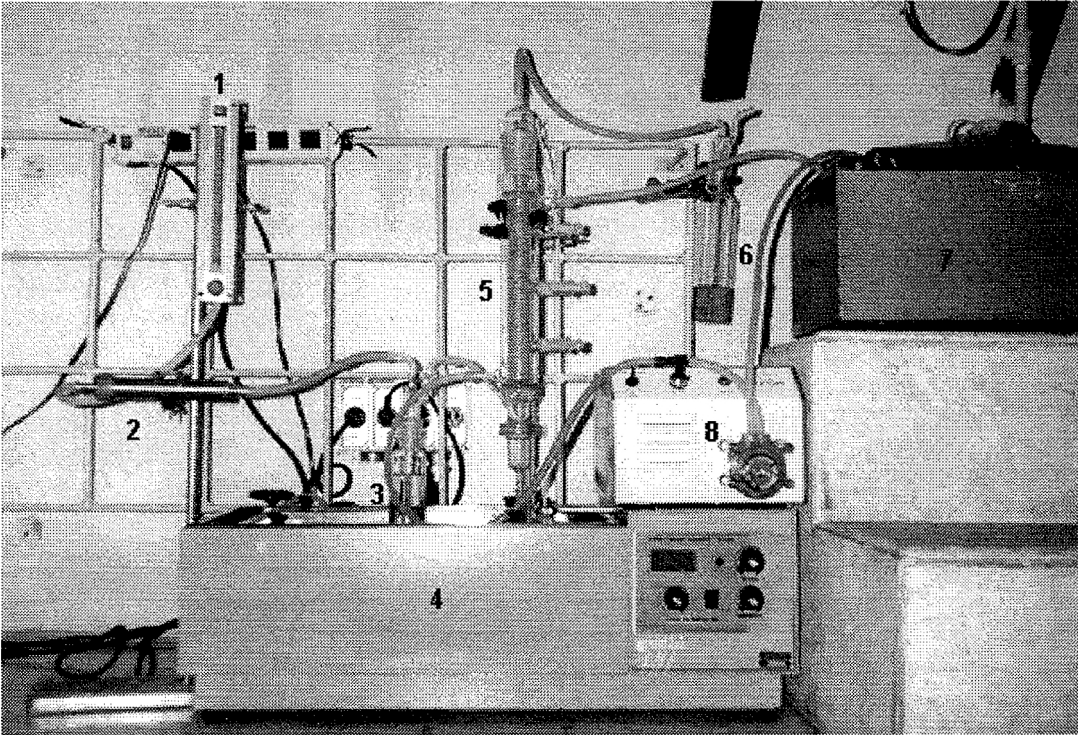


FIGURA 2 - Esquema representando o sistema de fermentação semi-sólida em reator de leito fixo, para obtenção de xilanase.

1 - rotâmetro; 2 - filtro de ar; 3 - umidificador do ar; 4 - banho termostatizado; 5 - coluna de fermentação; 6 - lavador de gases.

#### 4.9.1 - Produção de CO<sub>2</sub>

A produção de CO<sub>2</sub> durante a fermentação no reator de leito fixo foi acompanhada, acoplado-se na saída do reator um frasco lavador de gases contendo solução padronizada diluída de hidróxido de sódio (0,01 N). Ao final do tempo de incubação, a solução contida neste recipiente era titulada com uma solução padronizada de ácido clorídrico 0,01 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

#### 4.10 -AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados de atividade enzimática provenientes de fermentações em meio líquido foram expressos em U/ml, enquanto que os resultados da obtenção de xilanases em meio semi-sólido foram expressos em termos de atividade enzimática por grama de substrato inicial (U/g), determinada nos extratos provenientes da etapa de extração.

#### 4.11 -ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais provenientes do planejamento experimental foram analisados estatisticamente, de acordo com o planejamento pré-estabelecido, para verificar o nível de significância dos efeitos dos fatores em estudo.

A análise dos dados foi feita por meio do programa STATGRAPHICS, versão 60. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, erros-padrão, teste t de "Student", e ainda em tabelas de análise de variância.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - PARTE I

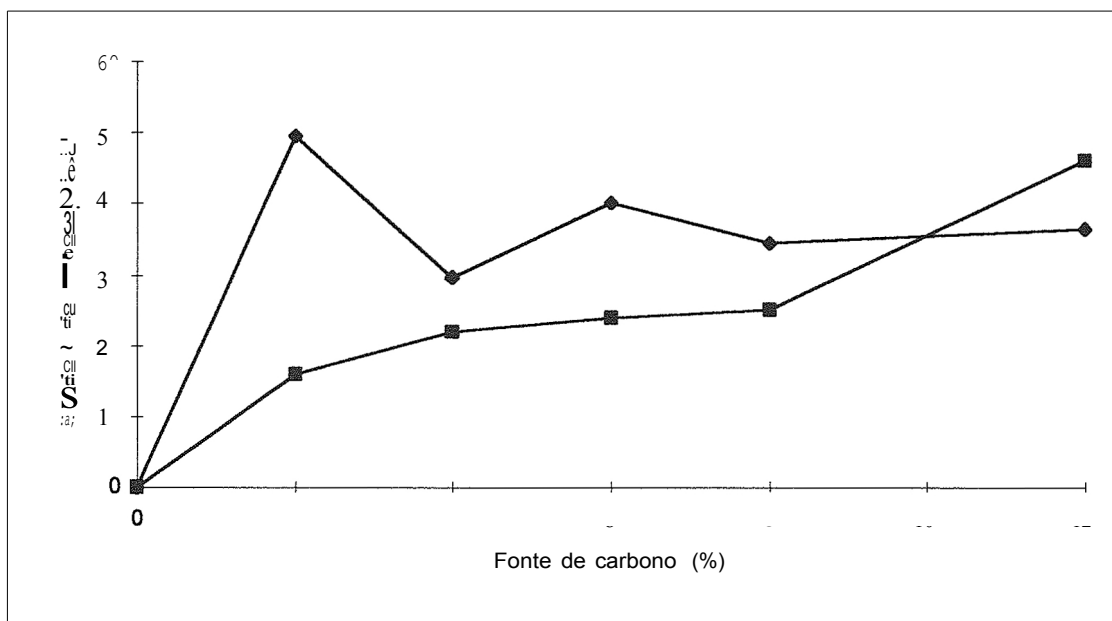
#### Produção de Atividade de Xilanase por *Thermoascus aurantiacus*

A obtenção de atividade de xilanase por fungos está diretamente relacionada com a composição do meio de cultura, às condições de cultivo e, finalmente, à etapa de recuperação da enzima do meio.

A utilização de substratos lignocelulósicos na forma sólida para produção de xilanases em larga escala tem-se mostrado economicamente viável (HALTRICH *et al.*, 1996). Além disso, quando utilizam-se esses substratos, as atividades enzimáticas produzidas, muitas vezes, são superiores às obtidas usando xilana pura (KESKAR, 1992). No entanto, para o desenvolvimento de um processo de fermentação em estado sólido com alta produtividade, uma série de variáveis devem ser controladas. Em relação à composição do meio, a escolha de um substrato apropriado, bem como o pré-tratamento adequado e o controle de sua umidade são determinantes na produção e extração da xilanase (MUDGETT, 1986).

### 5.1.1 - EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

É sabido que a utilização de substratos lignocelulósicos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo ou palha de trigo, casca de arroz e serragem de madeira, estimulam a produção de xilanases por fungos. Tendo em vista a eficiente produção de atividade de xilanase a partir dessas fontes renováveis, dois substratos de naturezas diferentes, farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar foram submetidos a experimentos de indução da enzima xilanase pelo fungo *T. aurantiacus*. Inicialmente, foi realizado um cultivo líquido em que as concentrações das fontes de carbono variaram entre 2% e 12%, conforme apresentado na FIGURA 3. As umidades iniciais correspondentes a cada concentração de substrato foram 98, 96, 94, 92 e 88%, respectivamente. As diferentes quantidades de substrato foram adicionadas às culturas com o objetivo de escolher a melhor concentração para indução da enzima. A atividade de xilanase foi determinada no décimo dia de crescimento fúngico e fez-se um controle sem adição dos substratos indutores.



**FIGURA 3 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de-açúcar ( • ) e farelo de trigo ( + ) na atividade de xilanase, expressa por volume de meio.**

*T. aurantiacus* foi cultivado por 10 dias a 45°C, sob condições estáticas em meio líquido de Vogel (2%), em diferentes concentrações dos substratos.

Diferentes concentrações de substratos influenciaram a produção de xilanase tanto em farelo de trigo como em bagaço de cana-de-açúcar. Quando farelo de trigo foi utilizado obteve-se o valor mais alto de atividade enzimática, na concentração de 2% (49,6 U/ml). Em concentrações acima de 4% a atividade de xilanase manteve-se aproximadamente constante, em torno de 35 U/ml. A produção de xilanase a partir do bagaço de cana-de-açúcar aumentou com a elevação da concentração do substrato sendo que a maior atividade foi obtida na concentração de 12% de bagaço (46,5 U/ml). Em concentrações de substrato que variaram de 2 a 8%, o farelo de trigo mostrou ser o substrato que induz as mais altas atividades de xilanase. Na concentração de 12%, porém, o bagaço de cana-de-açúcar superou o farelo de trigo como indutor de xilanase.

Comparando os níveis de atividade de xilanase obtidos com os encontrados na literatura, onde o mesmo fungo foi cultivado em meio líquido contendo xilana, verifica-se que os dois substratos avaliados nesse trabalho podem ser considerados bons indutores da enzima xilanase. GOMES *et al.* (1994) apresentaram resultados do cultivo de *T. aurantiacus* em meio líquido contendo 1 mg/ml de xilana durante 4 dias à 45°C e sob agitação de 150 rpm. As atividades de xilanase nestas condições foram de 26,2 U/ml e 9,74 U/ml quando utilizou-se xilana de faia e de bétula, respectivamente. Os resultados de produção de xilanase de *T. aurantiacus* reportados por KHANDKE *et al.* (1989), mostraram que dentre vários substratos, xilana foi o melhor indutor de xilanase (37,4 U/ml) e que o bagaço de cana-de-açúcar também induziu a atividade de xilanase (11,3 U/ml). Segundo resultados reportados por KESKAR (1992), farelo de trigo (24,0 U/ml) e bagaço de cana-de-açúcar (22,0 U/ml) foram melhores indutores de xilanase do que a xilana (16,6 U/ml), quando *Streptomyces* T7 foi cultivado em meio líquido contendo 2% (p/v) de substrato.

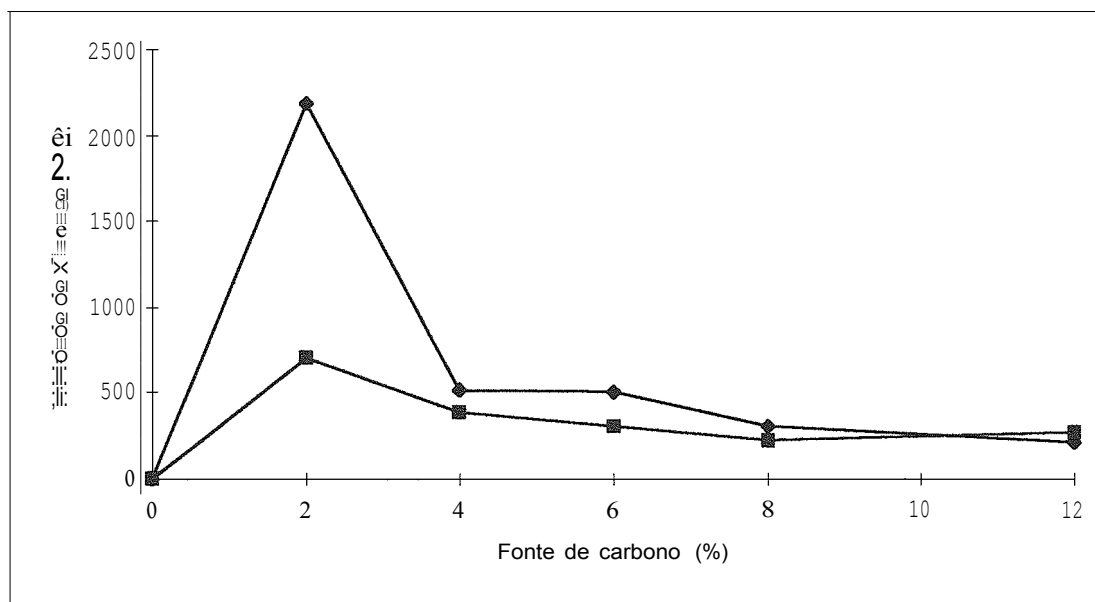
A capacidade de indução dos substratos utilizados pode estar relacionada às diferenças na composição dos mesmos. Bagaço de cana-de-açúcar é um substrato de natureza lignocelulósica, constituído de 19% de lignina, 46% de celulose, 24% de hemicelulose e 3% de extrativos (IMRIE, TILBURY, 1972), enquanto que o farelo de trigo é constituído principalmente de



carboidratos e proteína: 70% de carboidratos igualmente divididos entre celulose e hemicelulose, 17% de proteína, 7% de substâncias minerais, 5% de ácidos graxos e outros constituintes (BRUSHUK, 1986). Assim, apesar do farelo de trigo e do bagaço de cana-de-açúcar induzirem elevadas atividades de xilanase, o bagaço demonstrou ser mais vantajoso para uma fermentação em meio semi-sólido que o farelo, visto que existe uma tendência a uma maior produção de atividade de xilanase quando aumenta-se a concentração de substrato no meio (FIGURA 3).

Por outro lado, o farelo de trigo já foi muito utilizado como substrato em fermentações semi-sólidas e líquidas, para a produção de uma variedade de enzimas lignocelulolíticas por fungos. Devido ao seu alto conteúdo protéico, o farelo de trigo é capaz de sustentar um bom crescimento fúngico (LIN *et al.*, 1993). Entretanto, isso dificulta o processo de recuperação da xilanase, visto que uma série de proteínas contaminantes são produzidas juntamente com a enzima de interesse.

Analisando os mesmos resultados em termos de atividade enzimática produzida por grama de substrato (U/g), verificou-se que as melhores atividades foram obtidas na concentração de 2% para os dois substratos (FIGURA 4). Acima de 4% de farelo de trigo, observou-se uma redução crescente da atividade enzimática. Com o bagaço de cana-de-açúcar, o mesmo perfil de produção foi observado, porém valores inferiores foram obtidos em todas as concentrações, exceto quando utilizou-se 12% de bagaço de cana-de-açúcar.



**FIGURA 4 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de-açúcar ( • ) e farelo de trigo ( + ) na atividade de xilanase, expressa por grama de substrato.**

*T. aurantiacus* foi cultivado por 10 dias a 45°C, sob condições estáticas em meio líquido de Vogel (2%), acrescido de diferentes concentrações dos substratos.

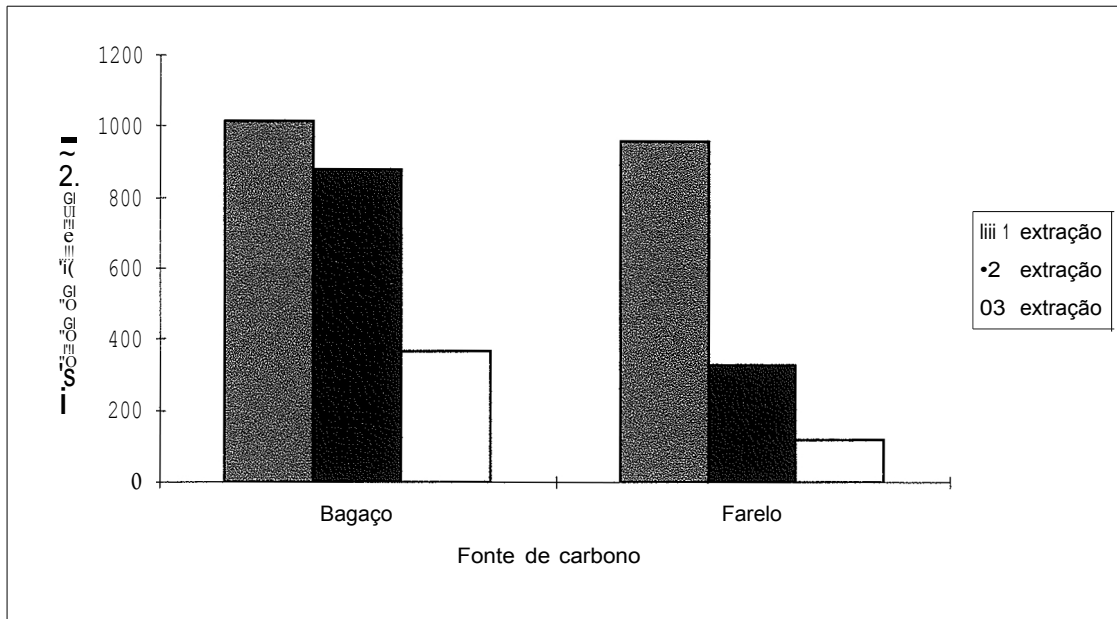
Conforme citado anteriormente, os resultados apresentados são provenientes de experimentos realizados em meio líquido. Quando se trata de fermentações semi-sólidas, a concentração de substrato é mais alta que as empregadas nesse experimento, devido à menor umidade do meio. Esta condição facilita a aeração do meio, tornando-a muito mais eficiente, e ainda proporciona o crescimento do microrganismo em toda a área superficial do substrato, o que poderia melhorar os resultados de produção de atividade de xilanase.

A literatura cita vários trabalhos referentes a obtenção de atividade de xilanase utilizando farelo de trigo ou bagaço de cana-de-açúcar através da fermentação semi-sólida. BISWAS *et al.* (1988) estudaram a produção de xilanase usando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar como substratos, tanto em meio líquido como em meio semi-sólido utilizando o fungo *Aspergillus ochraceus*. Eles observaram uma grande diferença na produção de xilanase

quando a fonte de carbono foi alterada. O bagaço de cana-de-açúcar proporcionou baixos rendimentos de enzima quando comparado com o farelo de trigo. Porém, quando comparou-se a fermentação submersa com a fermentação semi-sólida, os resultados mostraram que o cultivo dos dois substratos em meio semi-sólido foi muito mais eficiente. DUBEAU *et al.* (1986) reportaram os estudos dos cultivos de *Chaetomium cellulolyticum* em diferentes substratos: farelo de trigo, sabugo de milho e madeira. Os autores compararam os resultados das fermentações semi-sólidas com fermentações submersas, concluindo que o processo semi-sólido também foi mais eficiente.

Maiores atividades de xilanase foram obtidas quanto *T. aurantiacus* foi cultivado em meio semi-sólido. Utilizou-se 15 gramas de farelo de trigo ou bagaço de cana-de-açúcar, com umidade inicial de 67%, correspondendo a uma concentração de substrato de 32% em ambos os casos.

A FIGURA 5 mostra que em meio semi-sólido, o fungo *T. aurantiacus* produz elevadas atividades de xilanase, tanto em farelo de trigo como em bagaço de cana-de-açúcar. Na primeira extração, praticamente não houve diferença nas atividades de xilanase entre os dois substratos. O total de xilanase produzido na primeira extração foi 1012 U/g de substrato para bagaço de cana-de-açúcar e 995 U/g para farelo de trigo. Nas extrações subsequentes, uma maior quantidade de enzima foi recuperada do meio contendo bagaço.



**FIGURA 5 - Atividade de xilanase obtida por fermentação semi-sólida de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.**

*T. aurantiacus* foi cultivado durante 15 dias a 45°C sob condições estáticas em meio semi-sólido, com umidade inicial ajustada em 67%.

Os resultados deste último ensaio, quando comparados com a FIGURA 4, sugerem que em meio semi-sólido a produção de atividade de xilanase é maior, apesar da diferença nos tempos de incubação. Em meio líquido, 15 gramas de substrato renderam aproximadamente 250 U/g para ambos substratos em 10 dias de fermentação, enquanto que em meio semi-sólido esses valores de atividade aumentaram para aproximadamente 1000 U/g em 15 dias de incubação. A produção de xilanase por *T. aurantiacus* pode ainda ser aumentada estudando-se uma série de fatores que influenciam sua obtenção por fermentação semi-sólida.

### 5.1.2 - EXTRAÇÃO DA XILANASE

Extração em fermentação semi-sólida é um processo de recuperação de solutos de sólidos na forma de um extrato bruto, utilizando um solvente apropriado. Essa é uma importante operação unitária muito usada em fermentações semi-sólidas para obter produtos de meio fermentado. Produtos extracelulares apresentam-se normalmente solúveis no filme líquido presente sobre a superfície das partículas do substrato sólido e espalham-se por toda a fase aquosa acessível dentro dos sólidos. Em alguns casos, o produto pode encontrar-se na forma sólida, se a sua concentração ultrapassar o limite de solubilidade na água presente no sistema. Portanto, dependendo de seu valor agregado, é essencial lavar tanto quanto possível o produto dos sólidos (LONSANE, KRIAHNAIAH, 1992).

A eficiência da lavagem é crítica na determinação da viabilidade econômica do processo semi-sólido para produção de enzimas. Técnicas visando alcançar extratos altamente concentrados contendo a enzima de interesse tem recentemente recebido especial atenção (ILASARI, MITCHEL, 1996; KUMAR, LONSANE, 1988). No entanto, em vasta revisão bibliográfica nenhuma citação foi encontrada sobre o estudo da etapa de extração da enzima xilanase obtida por fermentação semi-sólida.

Vários são os fatores que influenciam significativamente no processo de extração, e conseqüentemente, na eficiência da extração: pré-tratamento dos sólidos fermentados; tipo de solvente; retenção do solvente pelos sólidos; mistura sólido-solvente; proporção de sólido-solvente; tempo de contato sólido-solvente; temperatura de contato e pH do sistema (LONSANE, KRIAHNAIAH, 1992). Neste estudo investigou-se apenas o efeito da temperatura e de sucessivas extrações da enzima, sendo que as demais variáveis foram mantidas constantes.

## EFEITO DE SUCESSIVAS EXTRAÇÕES

O efeito de sucessivas lavagens do substrato fermentado na extração da xilanase foi investigado visando recuperar a maior quantidade possível da enzima. Este ensaio foi realizado no experimento em meio líquido onde o efeito do tipo e da concentração do substrato foi estudado (item 5.1.1 ). De cada frasco foi separada a parte sólida por filtração, a qual foi submetida a cinco extrações utilizando tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,5. Após cada extração foi realizada a determinação da atividade de xilanase, que foi expressa em unidades totais ( $U = U/ml \times \text{Volume recuperado}$ ).

Nas fermentações em que o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como substrato, a recuperação de atividade de xilanase foi maior na primeira extração, independente da concentração de bagaço empregada (FIGURA 6). Quando as fermentações foram realizadas com maior concentração de bagaço obteve-se maior recuperação total da enzima. Os valores de atividade de xilanase diminuíram a cada lavagem e, após a quinta extração, apenas 3,9%, em média, de atividade de xilanase foi detectada.

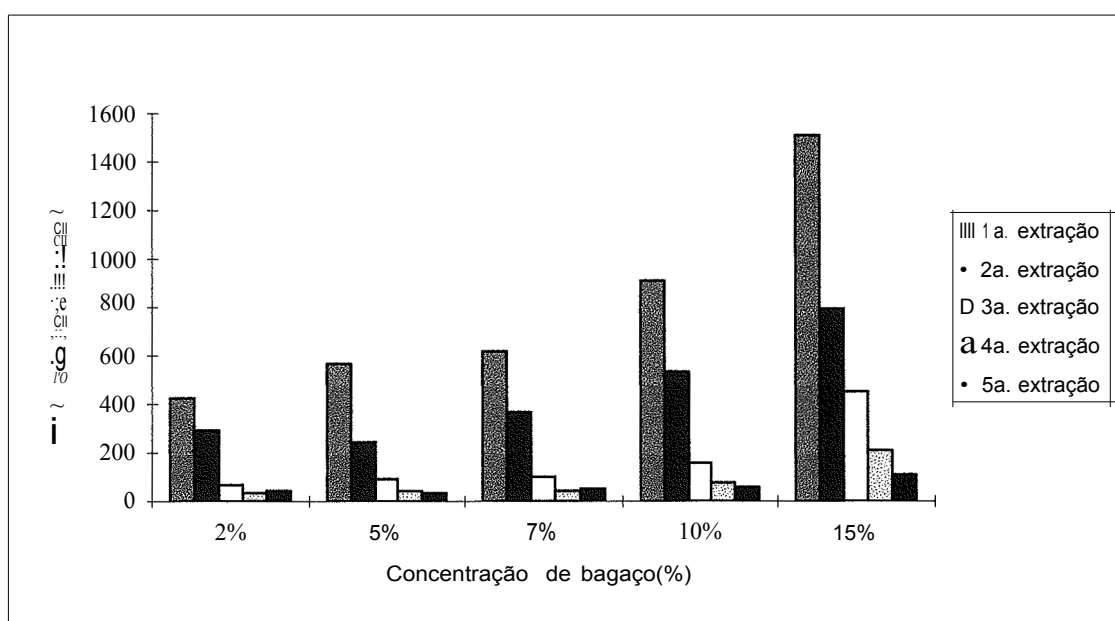
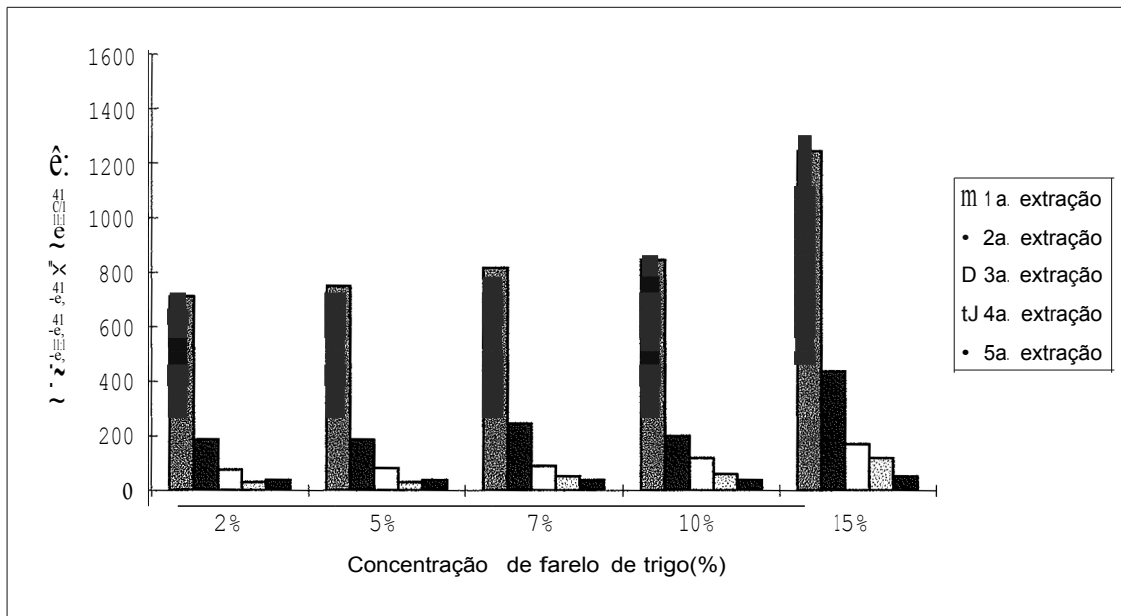


FIGURA 6 - Efeito de sucessivas extrações da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações.

Os sólidos fermentados foram acrescidos de volumes de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e submetidos a agitação em "shaker" à 60 rpm durante 60 min. Após separação por filtração a vácuo a extração foi repetida mais 4 vezes.

Para o farelo de trigo, a extração da xilanase também foi sempre maior na primeira extração, porém o efeito do aumento da concentração de farelo de trigo na recuperação de atividade de xilanase foi menos pronunciado para esse substrato (FIGURA 7). Nesse caso, após a quinta extração a atividade enzimática detectada nos extratos foi 3,1% em média.



**FIGURA 7 - Efeito de sucessivas extrações da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo farelo de trigo em diferentes concentrações.**

Os sólidos fermentados foram acrescidos de volumes de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 e submetidos a agitação em "shaker" à 60 rpm durante 60 min. Após separação por filtração a vácuo a extração foi repetida mais 4 vezes.

Considerando que após cinco extrações recupera-se 100% de toda enzima presente nos substratos, pode-se dizer que 52% foram recuperadas na primeira extração e 91% após a terceira extração, quando bagaço de cana-de-açúcar foi empregado. Quando farelo de trigo foi utilizado como substrato, esses valores foram de 66% e 92%, respectivamente. Desta forma, a realização de três lavagens para recuperação da enzima do meio semi-sólido foi

considerada suficiente para representar a atividade de xilanase produzida neste estudo.

#### EFEITO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

A temperatura de contato solvente/sólidos durante a etapa de extração de um produto obtido por fermentação semi-sólida é um fator de importância crítica. Temperaturas mais elevadas aumentam a velocidade de difusão do soluto, mas podem também desativar produtos sensíveis ao calor, como no caso de algumas enzimas (LONSANE, KRIAHNAIAH, 1992). No entanto, enzimas de microrganismos termofílicos são resistentes a temperaturas mais elevadas. Este fato faz com que as enzimas produzidas através da fermentação semi-sólida por microrganismos desta natureza possam ser extraídas do meio utilizando uma temperatura de contato elevada, proporcionando uma melhor eficiência do processo.

A literatura cita diversos trabalhos que confirmam a termoestabilidade da xilanase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* (KALOGERIS *et al.*, 1998; ALAM *et al.*, 1994; GOMES *et al.*, 1994; GRAJEK, 1987; TAN *et al.*, 1987; YU *et al.*, 1987). Desta forma, a extração da xilanase desse fungo, produzida em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada à 25 e 50°C.



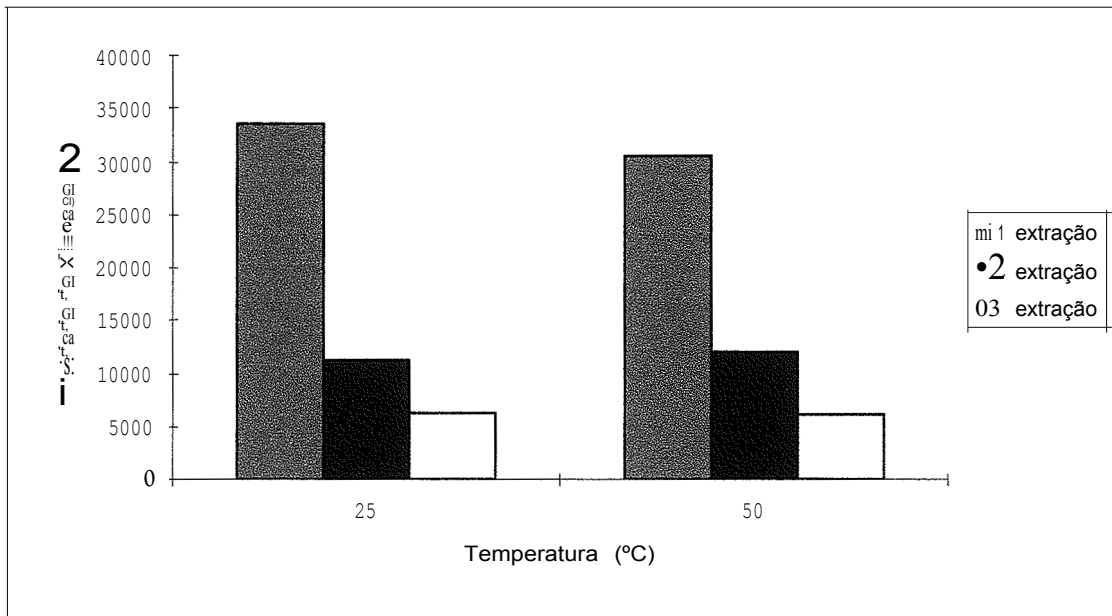


FIGURA 8 - Efeito da temperatura na extração da xilanase produzida em meio semi-sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar. Bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 81 % foi cultivado durante 10 dias a 45°C sob condições estáticas. Após fermentação, a etapa de extração foi executada sob duas diferentes temperaturas.

Como apresentado na FIGURA 8, a temperatura de contato sólidos-solvente praticamente não teve influência na recuperação da xilanase do meio semi-sólido. As quantidades de enzima extraídas do meio nas três extrações foram semelhantes, independente da temperatura de contato empregada. Apesar da literatura indicar uma maior eficiência da extração quando se utiliza temperaturas mais elevadas, isso não foi verificado em nossos experimentos. KUMAR & LONSANE (1987) também estudaram o efeito da temperatura na extração de um ácido obtido por fermentação semi-sólida. Eles observaram que a extração de ácido giberélico do meio semi-sólido foi independente da temperatura, na faixa de 25-40°C.

### 5.1.3 - DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus*

A determinação quantitativa do crescimento celular é uma das principais dificuldades encontradas ao se realizar estudos experimentais com fermentações em meio semi-sólido. Essa dificuldade é decorrente da impossibilidade de se separar quantitativamente o micélio do substrato sólido. Entre os métodos mais comumente usados para estimar a biomassa celular em meio semi-sólido, estão a determinação do conteúdo de glicosamina (MURTHY *et al.*, 1993; MITCHELL, 1992), de proteína (OOIJKAAS *et al.*, 1988; MITCHELL, 1992; GRAJEK, 1988) e análise do gás carbônico desprendido e do oxigênio consumido durante a fermentação (IKASARI, MITCHELL, 1988; MITCHELL, 1992; MAIORANO *et al.*, 1996).

A determinação do crescimento de *T. aurantiacus* foi realizada através da medida do teor de proteína do micélio. O procedimento constituiu em primeiramente cultivar o microrganismo em uma fonte de carbono facilmente assimilável e correlacionar a biomassa seca com proteína.

O teor de proteína do fungo foi obtido através da determinação do conteúdo de nitrogênio, pela metodologia descrita por Kjeldahl (SILVA, 1990). Sabendo-se que 16% de proteína constitui-se de nitrogênio, é possível calcular o conteúdo protéico do micélio.

#### CRESCIMENTO EM GLICOSE

O crescimento do fungo *T. aurantiacus* foi acompanhado pela determinação da massa seca em experimento realizado em meio líquido contendo glicose. Esse experimento teve como objetivo observar as fases do desenvolvimento do fungo em uma fonte de carbono de fácil assimilação e ao mesmo tempo determinar o conteúdo protéico desse fungo.

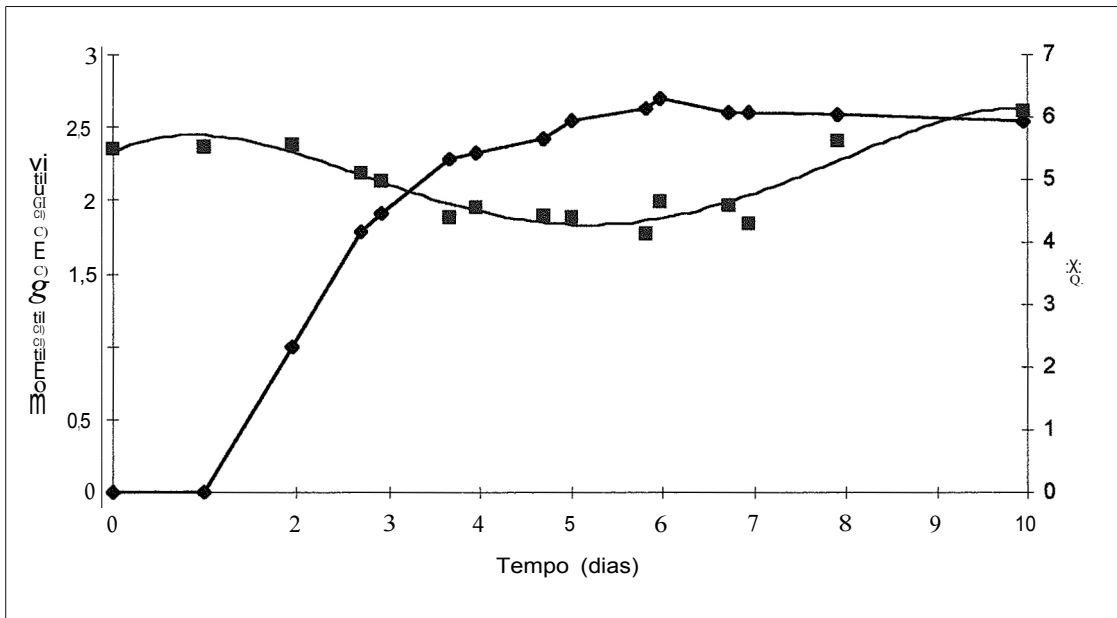


FIGURA 9 - Crescimento (•) e variação do pH (◻) durante cultivo do *T. aurantiacus* em meio líquido, contendo glicose. *T. aurantiacus* foi cultivado em meio líquido contendo glicose (2%) e solução salina de Vogel (2%) durante 10 dias sob condições estáticas a 45°C.

Como pode ser visto na FIGURA 9, vários estágios podem ser distinguidos com respeito à produção de biomassa e mudanças no pH do meio. O fungo iniciou seu crescimento após um dia de cultivo, e neste período o pH permaneceu constante. Nos 3 dias seguintes, o crescimento celular aumentou exponencialmente com o tempo, e o pH do meio, inicialmente igual a 5,5 baixou para 4,5. Após o 4º dia o crescimento foi mais lento e com 6 dias de cultivo alcançou o valor máximo.

Nesta fase foi calculada a correlação entre biomassa seca e proteína. O teor de proteína do micélio encontrado foi de 30,7%. O conteúdo de proteína micelial do mesmo fungo, segundo resultados de GRAJEK (1988) foi de 41,5%. A diferença nos resultados pode ser atribuída às diferentes proporções carbono/nitrogênio utilizadas em tais experimentos.

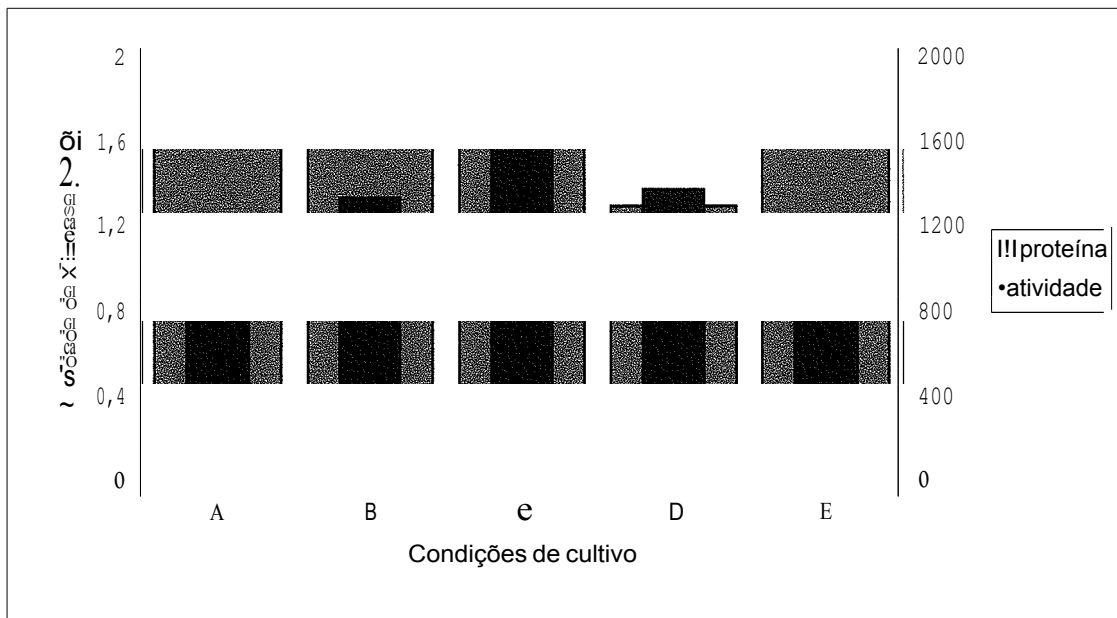
## CRESCIMENTO EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A estimativa do crescimento celular em bagaço de cana-de-açúcar foi realizada através do aumento da proteína do meio durante a fermentação.

Foram realizados diferentes ensaios visando determinar o crescimento do fungo *T. aurantiacus* em bagaço de cana-de-açúcar. A FIGURA 10 apresenta os valores dos teores de proteína determinados após fermentação de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes condições de cultivo. Em todos os ensaios o conteúdo de proteína do meio fermentado foi baixo, apesar da elevada atividade enzimática obtida nos extratos provenientes da primeira extração.

Modificações nas condições de cultivo foram realizadas almejando o aumento do crescimento celular, após verificar que o teor de proteína do meio fermentado não foi alterado no final de 20 dias na condição de cultivo A. A atividade enzimática foi alta no extrato proveniente deste ensaio (1061 U/g). Nos ensaios B e C, glicose (0,1%) e extrato de levedura (0,32%), foram acrescentados aos respectivos meios visando estimular a germinação de esporos, facilitando a colonização do meio. Apesar do aumento na atividade enzimática produzida nos ensaios B e C (1334 U/g e 1773 U/g, respectivamente), o teor de proteína ao final dos cultivos manteve-se inalterado. Quantidades mais elevadas de inóculo (ensaios D e E) e uma menor massa de bagaço de cana-de-açúcar (ensaio E) mostraram que o teor de proteína após o cultivo de *T. aurantiacus* em bagaço de cana-de-açúcar não ultrapassou 1,9%. Estes valores estão muito próximos do teor de proteína do bagaço de cana-de-açúcar (1,5%), não sendo possível, portanto, obter as informações desejadas quanto ao crescimento celular utilizando esta metodologia.

Deste modo, optou-se pela não determinação do crescimento celular durante os ensaios realizados em frascos Erlenmeyer. No ensaio de produção de atividade de xilanase em reator, a estimativa do crescimento foi feita através da análise do gás carbônico desprendido.



**FIGURA 10 - Teor de proteína e atividades enzimáticas produzidas por *T. aurantiacum* em diferentes condições de cultivo.**

A - 15g de bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 85%, 10<sup>4</sup> ascosporos/g e 20 dias de cultivo;

B - 15g de bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 85% e 0,1% de glicose, 10<sup>6</sup> ascosporos/g e 36 dias de cultivo;

C - 15g de bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 85% e 0,36% de extrato de levedura, 10<sup>6</sup> ascosporos/g e 10 dias de cultivo;

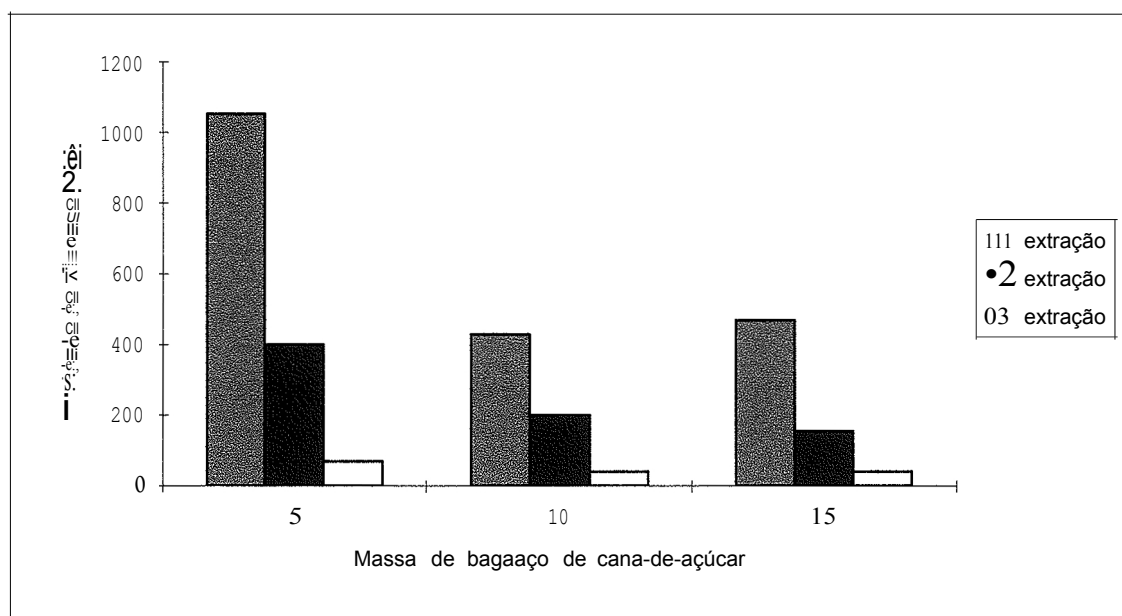
D - 15g de bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 85%, 10<sup>7</sup> ascosporos/g e 10 dias de cultivo;

E - 5g de bagaço de cana-de-açúcar com umidade inicial de 85%, 10<sup>7</sup> ascosporos/g e 10 dias de cultivo.

#### 5.1.4 - EFEITO DA MASSA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Em um processo de fermentação semi-sólida, a concentração de substrato pode ser considerada em termos do espaço total ocupado pelos sólidos no reator em relação às fases gasosa e líquida, ou ainda em termos de substrato disponível ao microrganismo nas fases sólida e líquida. Reatores com quantidades muito grandes de substrato sólido podem resultar numa reduzida área superficial exposta ao ar (PRIOR *et al.*, 1992). Exemplo disso foi observado com o fungo *Aspergillus awamori* onde baixos níveis de  $\alpha$ -galactosidase e invertase foram obtidos quando se aumentou a massa de substrato no reator (SILMAN, 1980). Para verificar a existência desse efeito na produção de xilanase pelo *T. aurantiacus*, diferentes massas de bagaço de cana-de-açúcar foram adicionadas ao meio de cultivo. Os resultados deste estudo estão apresentados na FIGURA 11.

Pode-se observar que a quantidade de substrato utilizada no cultivo semi-sólido exerce uma grande influência na produção de xilanase pelo *T. aurantiacus*. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando utilizou-se 5 gramas de bagaço de cana-de-açúcar, tanto quando analisou-se apenas os dados da primeira extração quanto a soma de três extrações. Um aumento na massa de substrato ocasionou uma diminuição da atividade enzimática.



**FIGURA 11 - Efeito da massa de bagaço de cana-de-açúcar na atividade de xilanase.**

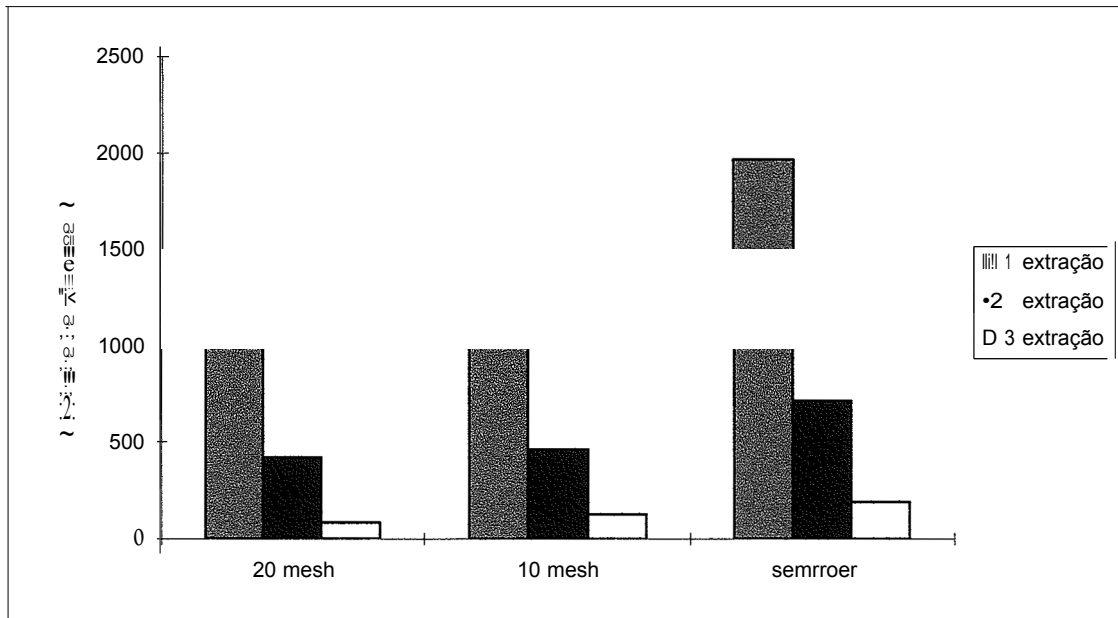
*T. aurantiacus* foi cultivado durante 10 dias a 45°C em Erlenmeyer de 300 ml contendo diferentes massas de substrato: 5, 10 e 15 gramas, com umidade inicial de 85%.

#### 5.1.5 - EFEITO DA GRANULOMETRIA DO BAGAÇO

A granulometria do substrato é citada na literatura como importante variável na produção de enzimas através da fermentação semi-sólida (MUDGETT, 1986). Quando moído, o substrato tem sua área superficial aumentada. Todavia, a diminuição do tamanho das partículas do substrato pode ocasionar uma compactação do substrato quando a umidade do meio é elevada.

Os resultados, apresentados na FIGURA 12, mostram que maiores atividades de xilanase foram obtidas quando bagaço de cana-de-açúcar, sem moer, foi utilizado como substrato. Partículas de menor tamanho produziram menores atividades de xilanase. Este comportamento foi similar nas 3 extrações realizadas para recuperação da enzima. Contrariamente, DUBEAU *et al.* (1986), obtiveram resultados que mostraram que a redução no tamanho do farelo de trigo, de 20 para 40 mesh, proporcionou um aumento na atividade enzimática

de 22,7 para 24,5 U/ml. Este aumento na atividade de xilanase provavelmente está relacionada ao aumento da área superficial, visto que a umidade inicial do meio foi 50%. A diferença com os resultados do presente trabalho pode ser atribuída à compactação do substrato, uma vez que os experimentos foram realizados a uma umidade inicial de 85%.



**FIGURA 12 - Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na produção de atividade de xilanase.**

*T. aurantiacus* foi cultivado durante 10 dias a 45°C em Erlenmeyer contendo 5 gramas de bagaço de cana-de-açúcar "in natura" e moído a 20 e 10 mesh, com umidade inicial de 85%.

Tendo em vista a influência da granulometria na produção de atividade de xilanase de *T. aurantiacus*, padronizou-se que as fibras do bagaço de cana-de-açúcar nos próximos experimentos seriam moídas numa granulometria de 7 mesh, pois a utilização do bagaço de cana-de-açúcar sem moer proporcionou dificuldades no manuseio, principalmente durante a homogeneização após a inoculação e na etapa de extração.

Com a realização desses experimentos iniciais, ficou definido que a próxima etapa deste trabalho, o estudo da otimização da produção de atividade



de xilanase de *T. aurantiacus* por fermentação semi-sólida, seria conduzido em frascos Erlenmeyers de 300 ml, utilizando bagaço de cana-de-açúcar moído a 7 mesh, embebido em solução salina de Vogel a 2%. A umidade inicial do meio, a massa de bagaço de cana-de-açúcar, a quantidade de inóculo e o tempo de cultivo foram estudados através de planejamento estatístico.

## 5.2 - PARTE II

### OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE EMERLENMEYER

O estudo de alguns fatores que influenciam a produção de xilanase de *T. aurantiacus* por fermentação semi-sólida foi realizado utilizando planejamento estatístico de experimentos. O planejamento experimental é uma ferramenta de grande utilidade e de auxílio na pesquisa científica, pois possibilita, com uma menor quantidade de experimentos, dar maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência das variáveis e principalmente suas interações sobre a variável dependente (BARROS NETO *et al.*, 1996; BOX *et al.*, 1978).

As variáveis escolhidas foram: umidade inicial do meio, quantidade de inóculo, massa de substrato e tempo de cultivo, tendo em vista a importância das mesmas no processo, bem como pensando na redução de custos para a produção da enzima. Segundo a literatura, a umidade do meio é um dos fatores mais críticos em processos semi-sólidos, e seu nível de utilização fica entre o mínimo para o crescimento microbiano e a um máximo que não haja água livre no sistema. A quantidade de inóculo e a massa de substrato, além de exercerem influência em um processo de fermentação semi-sólida, podem significar economia para a produção, quando utilizadas em seus níveis otimizados. Por fim, o tempo de incubação foi introduzido como variável na otimização da produção de xilanase, tendo em vista a necessidade de maiores tempos de cultivo quando se trata de fermentações semi-sólidas.

## 5.2.1 - 1ª FASE DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para otimizar a produção de xilanase considerando as quatro variáveis selecionadas para este estudo, escolheu-se um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , visando reduzir o número de ensaios a serem realizados e obter as informações desejadas quanto à influência de cada uma delas. Esse modelo foi escolhido, pois nesta fase interessa a característica local da superfície, ou seja, o seu gradiente, o qual indicará uma direção a tomar em busca da região de ótimo.

A matriz de planejamento utilizada nos experimentos de otimização da produção de xilanase, bem como a atividade enzimática obtida em cada um dos ensaios estão apresentados na TABELA 4. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e para cada experimento foi realizada uma repetição.

Número do ensaio	Fatores				Atividade de xilanase (U/g)	
	A	B	C	D	1ª repetição	2ª repetição
1	-1	-1	-1	-1	13	12
2	+1	-1	-1	+1	2250	2370
3	-1	+1	-1	+1	879	1122
4	+1	+1	-1	-1	1589	1118
5	-1	-1	+1	+1	870	997
6	+1	-1	+1	1	1242	1505
7	-1	+1	+1	-1	13	12
8	+1	+1	+1	+1	2750	2975
9	0	0	0	0	1665	1596
10	0	0	0	0	1514	1779

A= Umidade inicial(%): (-1 = 50; 0= 65; +1 = 80)

B = Tempo de incubação (dias): (-1 = 10; 0= 15; +1 = 20)

C = Concentração de inóculo (ascosporos/g): (-1 = 10<sup>4</sup>; 0= 5.10<sup>5</sup>; +1 = 10<sup>6</sup>)

D= Massa de substrato (g):(-1 = 5; 0= 10; +1 = 15)

As menores atividades de xilanase foram obtidas quando utilizou-se os fatores A (umidade) e D (massa de bagaço) em seus níveis mais baixos, ou seja, 50% e 5 gramas, respectivamente (ensaios 1 e 7). Por outro lado, as maiores atividades de xilanase foram obtidas quando esses níveis foram trocados para seus valores mais altos, correspondendo a uma umidade inicial de 80% e 15 gramas de bagaço de cana-de-açúcar (ensaios 2 e 8). Estes dados indicam que estas variáveis são importantes na produção de xilanase por fermentação semi-sólida.

Os efeitos individuais dos fatores estudados e suas interações na produção de xilanase são mostrados na TABELA 5.

**TABELA 5 - Efeitos estimados, erros-padrão e teste t de "Student" para o planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com 2 replicatas no ponto central.**

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	1313,8	+/- 58,6	
A	1482,1	+/-131,1	11,33*
B	149,9	+/-131,1	1,14
C	126,2	+/-131,1	0,96
D	1088,4	+/-131,1	8,30*
AB + CD	116,2	+/- 131,1	0,88
AC+BD	159,9	+/-131,1	1,22
AD+ BC	134,1	+/-131,1	1,02
bloco	70,1	+/- 117,2	0,59

A= Umidade inicial(%); B = Tempo de incubação (dias); C = Concentração de inóculo (ascosporos/g); D= Massa de substrato (g).

\* Significativo ao nível de 5% ( $t_{11,0,95} = 2,0215$ )

Como pode ser visto, a umidade inicial do meio (A) e a massa de substrato (D) apresentaram influência na produção de xilanase ao nível de 5% de probabilidade. Os efeitos estimados para umidade inicial do meio (A) e para a massa de substrato (D) foram positivos, indicando que do nível -1 para o nível +1, a atividade de xilanase produzida aumenta como função da umidade inicial

e da massa de substrato, respectivamente. Ou seja, maiores atividades de xilanase são produzidas quando a umidade inicial do meio é elevada e uma maior quantidade de massa de substrato é utilizada. Os efeitos destas variáveis são independentes dos outros fatores estudados, e não existem interações entre eles. Esta análise pode ser confirmada pela análise de variância (TABELA 6).

TABELA 6 - Análise de variância para o estudo da produção de xilanase por fermentação semi-sólida no planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com 2 replicatas no ponto central.

Efeito	SQ	GL	MQ	F	p
A	8822147,4	1	8822147,4	128,4	0,0000*
B	89964,0	1	89964,0	1,31	0,2769
C	63690,6	1	63690,6	0,9	0,3665
D	4738806,5	1	4738806,5	68,9	0,0000*
AB+CD	54026,0	1	54026,0	0,8	0,4035
AC+BD	102320,0	1	102320,0	1,5	0,2479
AD+BC	71933,9	1	71933,9	1,0	0,3283
bloco	24602,3	1	24602,3	0,4	0,5680
Erro total	756048,5	11	68731,7		
Total	14723539,4	19			

R = 0,95

A= Umidade inicial(%); B = Tempo de incubação (dias); C = Concentração de inóculo (ascosporos/g); D = Massa de substrato (g)

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

\* Significativo ao nível de 5%.

Como função destes resultados, os valores do coeficiente de regressão foram calculados e uma equação de primeira ordem pode ser escrita (EQUAÇÃO 1), considerando apenas os fatores significativos: umidade inicial do meio (A) e massa de substrato (D).

**EQUAÇÃO 1:**  $y = 1314 + 743A + 5440$

Nesta primeira fase do planejamento experimental, foram selecionadas dentre as variáveis estudadas, aquelas que mais influenciam na produção de xilanase de *T. aurantiacus* por fermentação semi-sólida. Os fatores tempo de cultivo (8) e quantidade de inóculo (C) não foram considerados estatisticamente significativos para o processo, portanto, podem ser utilizados em seus menores níveis. Deste modo, os experimentos seguintes tiveram seus tempos de fermentação padronizados em 10 dias (nível inferior de 8) e a concentração de inóculo ajustada para  $10^4$  ascosporos/g de bagaço (nível inferior de C).

A partir do modelo de primeira ordem obtido nesta primeira fase da otimização da produção de xilanase, partiu-se à procura de uma trajetória de máxima produção da enzima, também chamada de passo ascendente. A equação indica que aumentando a massa de bagaço de cana-de-açúcar e aumentando a umidade inicial do meio, a produção de atividade de xilanase pode ser melhorada. Porém, o aumento na umidade inicial do meio está limitada a um máximo de 85%. Acima desta umidade, água livre pode ocorrer no sistema, descaracterizando assim o processo de fermentação semi-sólida. O aumento da massa de substrato está limitado ao volume do frasco Erlenmeyer. O aumento excessivo de meio dentro do frasco implica em limitar o oxigênio disponível para o microrganismo. Deste modo, alguns experimentos foram realizados procurando explorar esta trajetória de máxima produção da enzima xilanase, dentro de limites admissíveis às características da fermentação semi-sólida.

## 5.2.2 - 2ª FASE DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO - PASSO ASCENDENTE

Baseando-se na equação de primeira ordem obtida, os níveis das variáveis A (umidade inicial) e D (massa de bagaço) a serem explorados foram determinados estatisticamente. Assim, experimentos foram realizados aumentando a umidade inicial do meio e aumentando a massa de substrato. A TABELA 7 - apresenta os resultados dos experimentos do passo ascendente, bem como os níveis utilizados na realização dos experimentos. Para obter os valores reais das variáveis codificadas, basta substituir os valores codificados por:

$$A = (\text{umidade} - 65)/15$$

$$D = (\text{massa}) - 10/5$$

TABELA 7 - Planejamento experimental para obtenção do passo ascendente.

Número do ensaio	A	D	Atividade de xilanase (U/g)
1	0	0	2341
2	0,33	0,2	2062
3	0,67	0,34	1927
4	1	0,5	2262
5	1,2	0,6	2939
6	1,33	0,65	2197
7	1,4	0,7	2859

A= Umidade inicial(%); D= Massa de bagaço de cana-de-açúcar (g).

Verifica-se que apesar do aumento simultâneo da umidade inicial do meio e da massa de substrato, não houve aumento na produção de xilanase. Isso indica que a condição de máxima produção da enzima encontra-se na própria região já estudada, ou seja, próximo de 80% de umidade inicial e de 15 gramas de bagaço de cana-de-açúcar.

Encontrada a região onde a produção de atividade de xilanase é máxima, isto é, a região que apresenta uma curvatura de máxima produção da enzima, novos experimentos foram realizados, visando obter uma superfície de resposta que representa o processo de produção de xilanase de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido, e conseqüentemente, um modelo matemático que descreva o processo de sua produção. Estes novos experimentos foram realizados na mesma região estudada anteriormente, porém ampliada através de um planejamento estrela. Esta ampliação foi necessária para que os dados obtidos pudessem ser ajustados a um modelo matemático de ordem maior que um.

### 5.2.3 - 3ª FASE DO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO - PLANEJAMENTO ESTRELA

Para fazer um planejamento em estrela, acrescenta-se ao planejamento já existente um planejamento idêntico, porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida, resultando em uma distribuição ortogonal. Este planejamento contou com 10 experimentos, dos quais 4 representam um fatorial completo  $2^2$ , 4 ensaios correspondentes à estrela e 2 ensaios no ponto central. Todos os ensaios foram confirmados através de duplicatas e repetições. Na TABELA 8 são apresentados os resultados referentes à produção de atividade de xilanase decorrentes deste planejamento, juntamente com os valores codificados das variáveis umidade inicial do meio e massa de substrato.



**TABELA 8 - Planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com 4 pontos estrela e 2 repetições no ponto central e resultados experimentais.**

Número do ensaio	Fatores		Atividade de Xilanase (U/g)	
	A	B	1 <sup>a</sup> repetição	2 <sup>a</sup> repetição
1	-1	-1	13	12
2	+1	-1	1416	1312
3	-1	+1	875	1060
4	+	+1	2500	2673
5	--v2	0	305	189
6	0	--v2	1012	1012
7	+v2	0	1598	1740
8	0	+v2	1696	1945
9	0	0	1665	1687
10	0	0	1513	1815

A= Umidade inicial(%):( --v2 = 44; -1 = 50; O= 65; +1 = 80; +v2 = 86)

D= Massa de bagaço (g): (--v2 = 2,9; -1 = 5; O= 10; +1 = 15; **+a** = 17)

Verifica-se que os menores valores foram obtidos quando a umidade do meio foi baixa. A menor atividade foi obtida quando 50% de umidade inicial estava associada à 5 gramas de bagaço de cana-de-açúcar (ensaio 1). A diminuição da umidade inicial do meio para 44% com simultâneo aumento da massa para 10 gramas causou um aumento na atividade enzimática (ensaio 5). Mantendo-se a umidade do meio em 50% e aumentando ainda mais a massa de substrato para 15 gramas, a atividade de xilanase teve seu valor aumentado (ensaio 3). Os valores de atividade de xilanase na condição de 50% de umidade inicial foram os mais baixos, porém, resultados com valores de atividades de xilanases próximos aos encontrados neste trabalho (292,6 U/g) foram obtidos para *T. aurantiacus* cultivado durante 7 dias à 55°C em 509 de bagaço de cana-de-açúcar, com umidade ajustada em 50% (ALAM *et ai.*, 1994). WIACEK-ZYCHLINSKA *et ai.* (1994) também estudaram a produção de xilanases em meio semi-sólido à 50% de umidade, porém com o fungo *Aspergillus niger*. O microrganismo foi inoculado em meio composto de uma

mistura de farelo de trigo e polpa de beterraba na proporção 4: 1, sais e extrato de levedura, totalizando 259, e cultivado estaticamente à 35°C durante 48 horas. Apesar das diferenças no modo de produção da enzima e do baixo período de cultivo, o valor da atividade enzimática por eles obtidos (297 U/g) está de acordo com resultados obtidos neste trabalho.

Os melhores resultados de atividade de xilanase apresentados na TABELA 8 foram obtidos quando 15g de bagaço de cana-de-açúcar teve sua umidade ajustada em 80% (ensaio 4). Estes valores são bastante superiores aos valores de atividade de xilanases encontrados na literatura. A melhor atividade de xilanase obtida por GRAJEK (1987) durante produção de xilanase em meio semi-sólido (96,7 U/g) foi proveniente do cultivo de *T. aurantiacus* em 10g de polpa de beterraba à 45°C durante 4 dias. Este valor é cerca de 26 vezes menor que os resultados obtidos no presente trabalho. Segundo ALAM *et al.* (1994), *Thermomyces lanuginosus* produziu 1900 U/g de atividade de xilanase com 50 g de meio contendo farelo de trigo como substrato e umidade inicial de 80%. Comparando os dados da literatura com os resultados obtidos neste trabalho, apesar das muitas diferenças nas condições da produção da enzima, percebe-se que as atividades de xilanases produzidas em cultivo semi-sólido de bagaço de cana-de-açúcar pelo *T. aurantiacus* foram bastante elevadas.

A análise estatística dos dados apresentados na TABELA 8 foi realizada a fim de determinar o efeito principal das variáveis juntamente com suas interações sobre a resposta em estudo. Os resultados deste estudo estão apresentados na TABELA 9. A análise estatística dos resultados mostrou que as duas variáveis estudadas apresentam efeitos principais ao nível de 5% de probabilidade. Pelo resultado do teste t de "Student" pode-se observar que estas variáveis apresentaram valores de t superiores ao tabelado (4,302). O teste t mostrou também que a variável umidade inicial sofre uma interação quadrática A<sub>2</sub> significativa ao nível de 5% de probabilidade, indicando que o modelo que representa o processo não é linear.

**TABELA 9 - Efeitos estimados, valores de teste t de "Student" e erros-padrão obtidos no planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com estrela e 2 ensaios no ponto central.**

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-padrão	t
A	1670,5	+/- 49,8	
D	1245,4	+/- 49,8	25,012*
AD	830,1	+/- 49,8	16,672*
A <sup>2</sup>	134,1	+/- 70,4	1,904
O <sub>2</sub>	-689,4	+/- 68,8	10,466
bloco	231,5	+/- 65,8	3,514
	85,2	+/- 44,5	1,91

A= Umidade inicial do meio(%); D= Massa de bagaço de cana-de-açúcar (g)

\* Significativos (h.o,95 = 4,302)

Pela análise de variância comprova-se os resultados do teste t e obtém-se uma correlação de 0,94. Os resultados estatísticos deste estudo encontram-se na TABELA 10.

**TABELA 10 - Análise de variância para o estudo da produção de xilanase por fermentação semi-sólida no planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com estrela e 2 ensaios no ponto central.**

Efeito	SQ	GL	MQ	F	p
A	6203867,5	1	6203867,5	625,6	0,0016
D	2756475,8	1	2756475,8	277,9	0,0036
AD	35968,3	1	35968,3	3,63	0,1971
A <sup>2</sup>	1086192,4	1	1086192,4	109,5	0,0090
O <sub>2</sub>	122455,1	1	122455,1	12,3	0,0723
Bloco	36310,5	1	36310,5	3,6	0,1958
Falta de ajuste	580306,2	11	52755,1	5,3	0,1688
Erro puro	19832,9	2	9916,4		
Total	10730413,4	19			

R = 0,94;

A= Umidade inicial do meio(%); D= Massa de bagaço (g)

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Considerando as variáveis significativas A, D e A2 e desprezando as demais, foi feita uma análise do coeficiente de regressão do modelo. A análise de variância da regressão e o coeficiente de determinação do modelo  $R^2 = 0,93$ , revelaram que o modelo representa o processo de produção de xilanase em meio semi-sólido. Os resultados estatísticos deste estudo encontram-se nas TABELAS 11 e 12.

TABELA 11 - Coeficiente de regressão, erros-padrão, teste t de "Student" e nível de significância para o modelo que representa o processo de produção de xilanases por fermentação semi-sólida, utilizando planejamento experimental 2<sup>2</sup> em estrela.

Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	t	e
média	1538,2	+/- 72,9	21,083	0,0000
A	622,7	+/- 55,7	11,175	0,0000
D	415,1	+/- 55,7	7,448	0,0000
A2	-295,1	+/- 99,6	-4,430	0,0004

A= Umidade inicial(%); D= Massa de bagaço (g)

TABELA 12 - Análise de variância da regressão para o modelo que representa o processo de produção de xilanase em meio semi-sólido no planejamento 2<sup>2</sup> em estrela.

CV	SQ	GL	MQ	F	e
Modelo	9935540	3	3311847	66,6	0,0000
Erro	794873	16	49679,6		
Total					

R = 0,93

CV = causa da variação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Em função dos resultados apresentados, o modelo matemático obtido, o qual representa o processo de produção de atividade de xilanase em

meio semi-sólido pode ser expresso pela EQUAÇÃO 2, onde Y representa a atividade enzimática obtida (U/g de bagaço inicial) e A e D os níveis dos fatores umidade inicial do meio e massa de substrato, respectivamente. Para obter os valores reais destas variáveis, deve-se substituir os valores codificados nas EQUAÇÕES 3 e 4.

**EQUAÇÃO 2:**  $Y = 1538 + 622A + 4150D - 295A^2 - 590AD$

EQUAÇÃO 3:  $A = (\text{Umidade} - 65) / 15$

EQUAÇÃO 4:  $D = (\text{Massa} - 10) / 5$

Uma técnica algébrica para determinar os valores ótimos das variáveis que tornam máxima uma função, consiste em igualar a zero as derivadas parciais desta função. Aplicando esta técnica no modelo que representa a produção de xilanase em meio semi-sólido, temos:

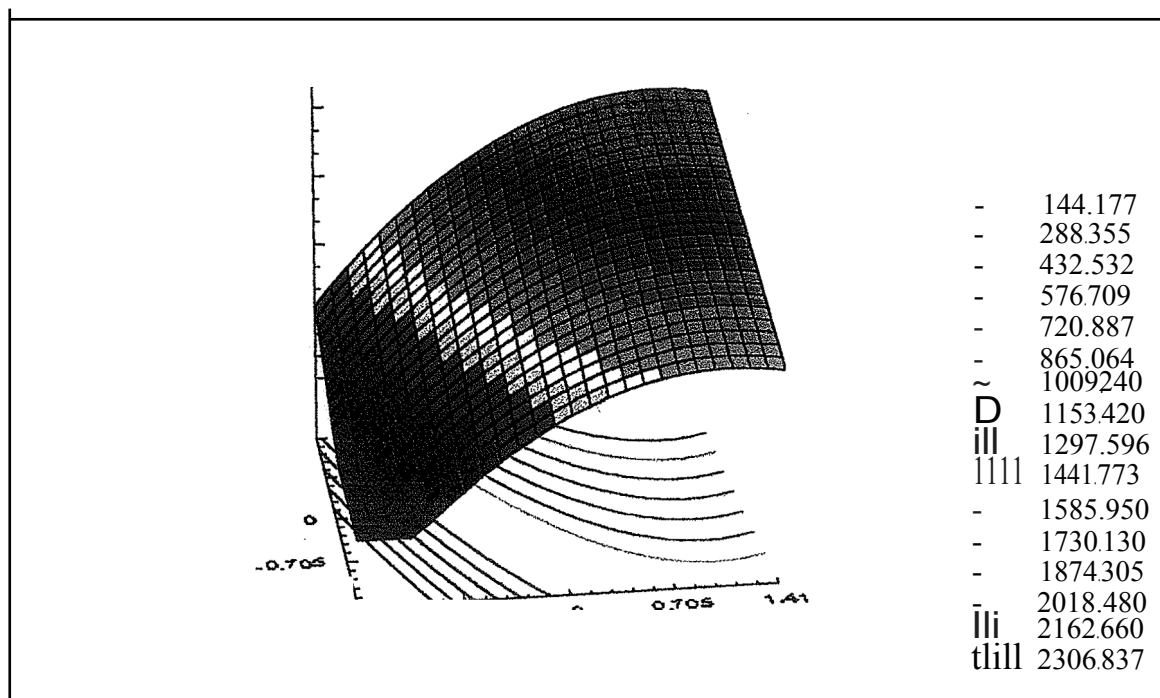
$$dY/dA = 622 - 590A = 0$$

$$dY/dD > 0 \Rightarrow \text{ponto de máximo local}$$

A partir da derivada tem-se que  $A = 1,05$  e  $D = 1,41$  (maior valor codificado). Substituindo esses valores codificados nas equações 3 e 4 determina-se que as melhores condições para produção de xilanase de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido são obtidas quando forem utilizados 81% de umidade inicial e 17 g de bagaço de cana-de-açúcar. Nestas condições, a atividade máxima estimada pelo modelo é de 2451 U/g de bagaço inicial.

As curvas de nível e a superfície de resposta correspondente ao modelo estão apresentadas na FIGURA 13. É possível observar na superfície

de resposta que a máxima produção obtida encontra-se em torno de 2400 U/g de bagaço. Além disso, através das linhas de contorno, percebe-se que a otimização do processo tende para a região de elevada umidade e maior massa de substrato.



**FIGURA 13 - Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo da EQUAÇÃO 2, que representa o processo de produção de atividade de xilanase em meio semi-sólido.**

Após estabelecidas as melhores condições de produção de xilanase em meio semi-sólido, foi realizado um cultivo sob as condições otimizadas: umidade inicial: 81%; tempo de cultivo: 10 dias; concentração de inóculo: 10<sup>4</sup> ascosporos/g e massa de bagaço: 17 gramas. O valor de atividade de xilanase obtido experimentalmente foi de 2700 U/g, o qual foi próximo ao previsto pelo

modelo - 2451 U/g, indicando que o modelo obtido descreve o processo de obtenção de atividade de xilanase de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido.

#### 5.2.4 - CURVA DE PRODUÇÃO DE XILANASE

Uma vez determinadas as condições otimizadas para produção de xilanase de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido, foi realizada uma curva de produção da enzima em tais condições durante 10 dias de cultivo (FIGURA 14). Decidiu-se estudar este período de produção de xilanase tendo em vista o fator tempo não ter sido significativo (10 a 20 dias).

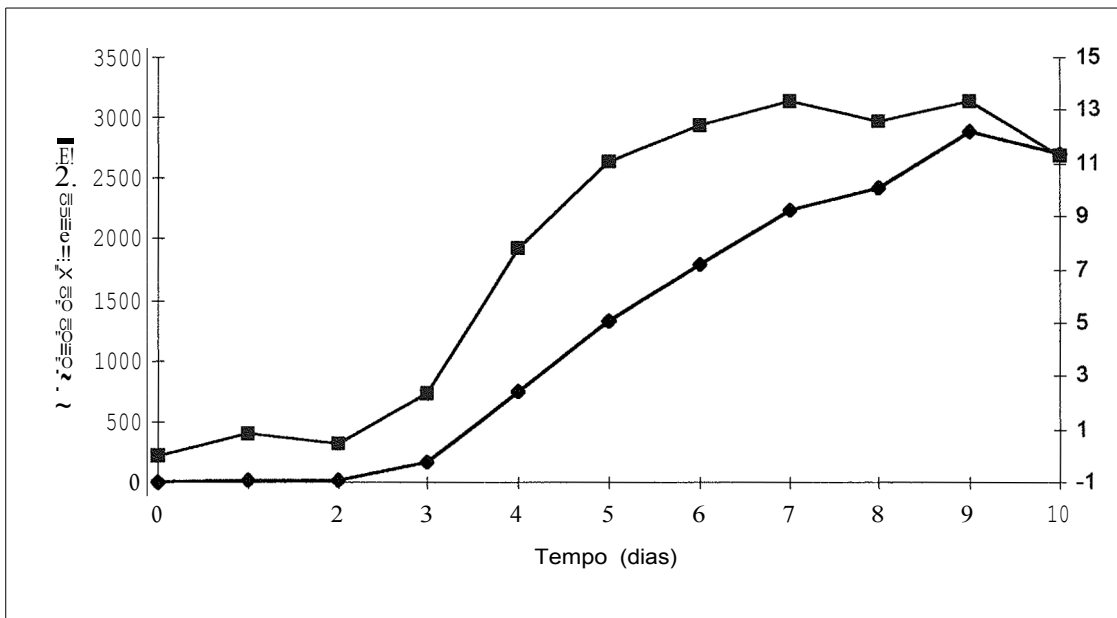


FIGURA 14 - Curvas de produção de atividade de xilanase ( + ) e sua produtividade ( - ) durante cultivo de *T. aurantiacus* em meio semi-sólido, nas condições otimizadas em Erlenmeyer.

Bagaço de cana-de-açúcar (17g - massa seca) com umidade inicial de 81% e inoculado com  $10^4$  ascósporos/g de substrato foi cultivado durante períodos de tempo que variaram de 1 a 10 dias em condições estáticas a 45°C.

Durante os dois primeiros dias de cultivo não foi detectada nenhuma atividade de xilanase. A partir do segundo dia de fermentação iniciou-se a produção da enzima, alcançando o valor máximo de atividade de xilanase de 2880 U/g com 9 dias de cultivo.

Pela curva de produção de xilanase, verifica-se que após 9 dias de incubação a produção de xilanase em meio semi-sólido não é favorecida, nas condições estudadas.

A curva de produtividade de atividade de xilanase confirma tal fato, pois verificou-se um aumento dos valores até o sétimo dia de cultivo, após o qual manteve-se estável.

Esses resultados indicaram a possibilidade de realizar cultivos com tempos ainda mais curtos que os utilizados no projeto de otimização, o que reduziria o custo de produção de xilanase.



### 5.3-PARTE UI

#### PRODUÇÃO DE XILANASE EM REATOR DE LEITO FIXO

As informações disponíveis na literatura no que diz respeito a produção de enzimas, como por exemplo xilanases, em reatores são escassas. Em geral, fermentações semi-sólidas são realizadas em fermentadores do tipo bandeja. Uma distribuição desuniforme de gases (oxigênio e dióxido de carbono) e gradientes de temperatura existem nesses tipos de fermentadores. A utilização de sistemas de leito fixo pode diminuir na maioria das vezes, minimizar esses gradientes, melhorando a produção de atividades enzimáticas, empregando-se aeração forçada (GOWTHAMAN *et al.*, 1993; GOWTHAMAN *et al.*, 1995). Assim, nos últimos anos, a produção de enzimas em fermentadores de leito fixo têm recebido atenção especial, tanto no que diz respeito à produção de enzimas (ARCHANA, SATYANARAYANA, 1997) como na produção de ácidos e outros metabólitos (RAIMBAULT, 1997).

Deste modo, foram realizados cultivos semi-sólidos em um reator de leito fixo nas mesmas condições otimizadas em Erlenmeyer: 17g de bagaço de cana-de-açúcar, 81% de umidade inicial e  $10^4$  ascósporos/g de substrato. A fim de comparar os resultados obtidos com a fermentação realizada em Erlenmeyer. A entrada de ar no reator foi controlada por rotâmetro, fixando-se a vazão em 1,5 Umin. Para manter a umidade do meio na condição desejada, o ar foi passado por um umidificador antes de entrar no reator.

Para acompanhar a produção de atividade de xilanase em reator de leito fixo, foram realizadas 8 fermentações. A cada dia, o conteúdo total da coluna foi submetido à extração da enzima e determinada a atividade de xilanase. Na Figura 15 estão apresentados os resultados da cinética de produção da enzima no reator de leito fixo. A produção de atividade de xilanase no reator ocorreu a partir do segundo dia e aumentou até o décimo dia de

fermentação. A produção de atividade de xilanase foi rápida até o terceiro dia, mas a partir do quarto dia de cultivo, apesar da atividade de xilanase continuar aumentando até o décimo dia, ocorreu de forma menos acentuada.

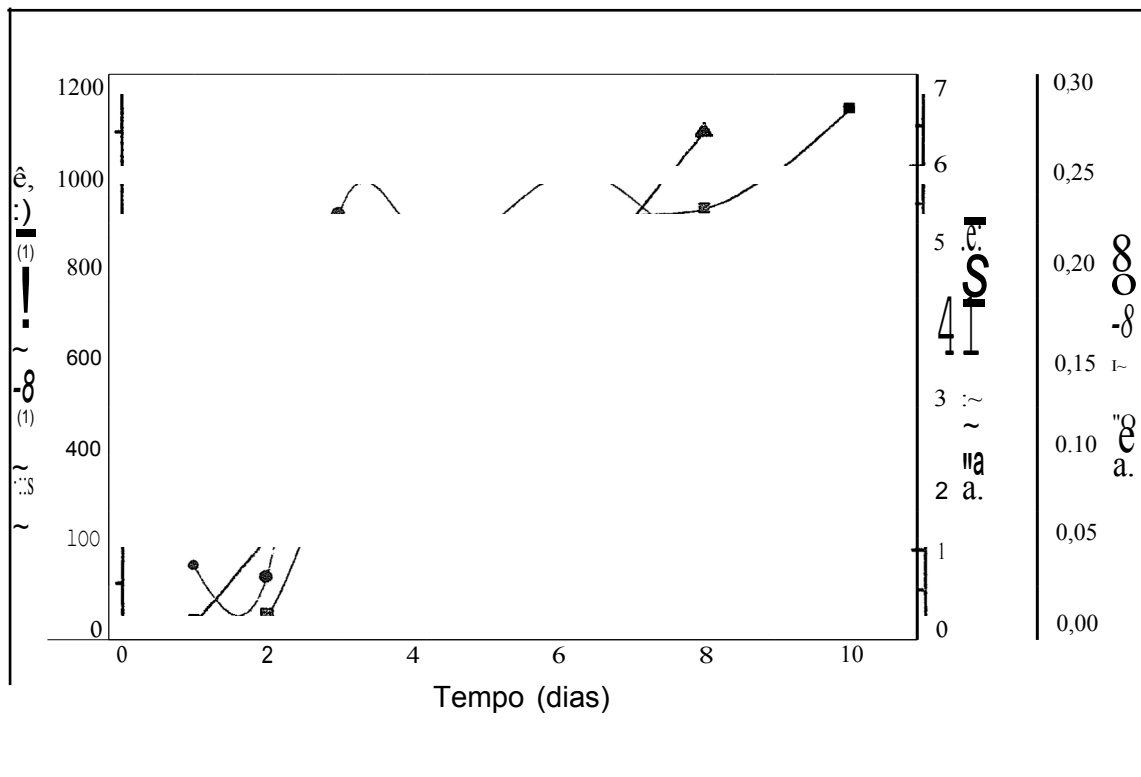


FIGURA 15 - Produção de atividade de xilanase (•), produtividade (-) e evolução da produção de CO<sub>2</sub> (Δ) durante cultivo semi-sólido de *T. aurantiacus* em reator de leito fixo.

17 gramas de bagaço de cana-de-açúcar, com umidade inicial de 81% após inoculação com 10<sup>4</sup> ascósporos/g de substrato foram empacotados no reator de leito fixo. Ar aquecido foi passado através da coluna de fermentação numa vazão de 1,5 U/minuto, e a temperatura do sistema foi mantida a 45°C.

A produtividade de atividade de xilanase em reator de leito fixo também foi determinada e observa-se que a partir do segundo dia houve um acentuado aumento na produtividade de xilanase. A partir do terceiro dia, no entanto, a produtividade manteve-se constante, até o sexto dia, a partir do qual foi observado um pequeno decréscimo.

Em relação às curvas de produção da enzima em Erlenmeyer (FIGURA 14) e em reator de leito fixo (FIGURA 15), pode-se perceber a grande influência da geometria do reator, da aeração, da compactação do substrato e outros fatores, na atividade de xilanase. No reator de leito fixo, até o terceiro dia de cultivo, a produção de atividade de xilanase foi maior que em Erlenmeyer (386 U/g e 170 U/g, respectivamente). No entanto, essa tendência não foi continuada no decorrer dos dias subsequentes. A produção da enzima a partir do quarto dia foi muito mais lenta no reator de leito fixo do que em Erlenmeyer. Em reator, o máximo valor de atividade de xilanase encontrado foi 1150 U/g, ao final de 10 dias, enquanto que 2880 U/g de atividade enzimática foi obtido no nono dia de cultivo quando a fermentação foi realizada em Erlenmeyer. Esses resultados diferem da literatura, onde vários autores demonstraram que em reatores de leito fixo, os resultados obtidos são muito mais relevantes quando comparados com a produção em Erlenmeyer. ARCHANA & SATYANARA YANA (1997) observaram um aumento na atividade de xilanase de *Bacillus licheniformis* A99 produzida em reator em coluna quando comparada com a produção em frascos Erlenmeyer. PANDEY *et al.*, (1996) também demonstraram que a produção de glicocoxilase pelo microrganismo *Aspergillus niger* em reator de leito fixo foi 50% superior da obtida em frascos Erlenmeyer.

O acompanhamento da liberação de CO<sub>2</sub> durante a obtenção das curvas de produção de atividade de xilanase em reator de leito fixo também está relatado na FIGURA 15. Verifica-se que a partir do primeiro dia de cultivo, até o quarto dia, houve um aumento no CO<sub>2</sub> liberado pelo microrganismo. A partir do quarto, até o sexto dia, a formação desse gás manteve-se constante, aumentando novamente no oitavo dia de cultivo.

Esses resultados indicam que houve um aumento no crescimento celular durante todo o período estudado, indicado pelo aumento na respiração (aumento da concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de exaustão do reator). Tendo em vista este fato, pode-se considerar que a baixa atividade de xilanase obtida nos ensaios realizados no reator não está relacionada ao crescimento, mas a

outros fatores, como compactação do substrato, geometria do reator, fornecimento de oxigênio, etc.

## 6-CONCLUSÕES

A otimização da produção de xilanases termoestáveis a partir de materiais poliméricos em forma sólida é uma importante área da biotecnologia, muito promissora para aplicação em processos industriais. Seu uso no branqueamento de polpas celulósicas, constitui-se numa forma alternativa, ou mesmo de substituição dos métodos convencionais de tratamento com grandes possibilidades de eliminação dos problemas ambientais associados. A viabilidade de utilização de xilanases em processos industriais vai depender das características físico-químicas da enzima e também do nível em que a mesma é produzida. É portanto, necessário desenvolver estudos experimentais no sentido de controlar eficientemente o processo de produção através da aplicação de técnicas de otimização.

Nesse trabalho, foi realizado um estudo para a produção de xilanases em meio semi-sólido a partir de um fungo termofílico, o qual permitiu que fossem extraídas as seguintes conclusões:

- A produção de atividade de xilanase por *T.aurantiacus* é regulada por diversas variáveis do meio de cultura, principalmente natureza e

concentração do substrato. Farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar induziram altos níveis de atividade de xilanase em estado sólido, quando comparado com meio líquido.

- Tendo em vista o baixo teor protéico apresentado pelo bagaço de cana-de-açúcar, e que o aumento de sua massa proporciona um aumento da atividade enzimática, esse substrato foi utilizado como indutor de xilanase.
- Através da aplicação de um procedimento estatístico, onde usou-se um fatorial a dois níveis, foi realizada uma análise considerando 4 variáveis do processo. Foi possível verificar que a umidade inicial do meio e a massa de substrato foram as variáveis que mais exerceram influência na produção de xilanase. Uma maior massa de bagaço de cana-de-açúcar associada a uma elevada umidade inicial do meio, proporcionaram as maiores atividades de xilanase.
- A obtenção de xilanase em meio semi-sólido foi otimizada, obtendo-se um modelo matemático que representa o processo com um nível de 95% de confiança.
- O fungo cresceu e produziu xilanase no reator de leito fixo. A produção de atividade de xilanase aumentou com o tempo, porém, em termos de produtividade de xilanase, o valor máximo atingido foi no terceiro dia, a partir do qual, manteve-se aproximadamente constante até o décimo dia.

## 7 – SUGESTÕES

Tendo em vista dar continuidade a este trabalho, sugere-se que em trabalhos futuros sejam estudadas:

- A formação de CO<sub>2</sub> na condição otimizada em Erlenmeyer, e relacionar esta produção com a formação de biomassa, a fim de que se possam determinar os parâmetros cinéticos  $\mu_{\max}$ ,  $\mu_s$  e  $\mu_p$ .
- A inoculação do microrganismo no reator de leito fixo por percolação, bem como a extração da enzima, utilizando o mesmo sistema.
- A produção da enzima em reator de leito fixo, através da variação da carga de substrato na coluna e da vazão de ar fornecido ao meio de cultivo.
- Novas formas de fermentação em coluna, como a fermentação em leito fluidizado.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANS, P. R. Growth and amylase production of *Thermoascus aurantiacus* Miede. Biotechnol. Appl. Biochem, v. 15, p. 311-313, 1992.
- ALAM, M., GOMES, I., MOHIUDDIN, G., HOQ, M. M., Production and characterization of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. Enzyme and Microbial Technology, v. 16, p. 298-302, 1994.
- ARCHANA, A, SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v. 21, p. 1217, 1997.
- AUER, C. G. Levantamento de fungos termófilos associados a pilhas de cavacos de **Eucaliptos** sp. Escola Superior de Agricultura «Luiz Queirós" Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP., Brasil, 87p, 1986, Dissertação de Mestrado.
- BABU, K. R., SATYANARAYANA, T. o-amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans*; in solid-state fermentation. Proc. Biochem, v. 30, p. 305-309, 1995.



- BAYLEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, n. 3, p. 257-271, 1992.
- BANDELIER, S., RENAUD, R., DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-bed solid-state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochemistry*, v.32, n. 2, p. 141-145, 1997.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Otimização e planejamento de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 291p.
- BECERRA, M., SISO, M. I. G. Yeast  $\alpha$ -galactosidase in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 39-44, 1996.
- BISWAS, S. R., MISHRA, A. K., NANDA, G. Xylanase and  $\alpha$ -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnology and Bioengineering*, v.31, p. 613-616, 1988.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experimenter. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York, Wiley, 1978. 653p.
- BUSHUK, W. Wheat chemistry and uses. *Cereals Foods World*, v. 31, p. 218-226, 1986.
- CHATTERJEE, R., DUTTA, A., BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B. C. Production of tannase by solid-state fermentation, *Bioprocess Engineering*, v. 14, p. 159-162, 1996.
- CROOKE, P. S., HONG, K., MALANEY, G. W., TANNER, R. D. Solid and semi-solid bioreactors: static, rotating and fluidized bed fermentors. *Journal of the Biomass Energy Society of China*, v. 10, p. 1-17, 1991.

- DESCHAMPS, F., HUET, M. C.  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 6, n. 1, p. 55-60, 1984.
- DUBEAU, H., CHAHAL, D. S., ISHAQUE, M., Production of xylanases by *Chaetomium celfuiolyticum* during growth on lignocelluloses. *Biotechnology Letters*, v. 8, n. 6, p. 445-448, 1986.
- FERNÁNDEZ, M., PÉREZ-CORREA, J. R., SOLAR, I., AGOSIN, E. Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering*, v. 16, p. 1-4, 1996.
- FROST, G. M., MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: REHM, H. J., REED, G. eds. *Biotechnology: a Comprehensive Treatise in 8 Volumes*. Weinheim: VCH, 1987. v. 7a, cap. 3, p. 65-211.
- GOMES, D. J., GOMES, J., STEINER, W. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. *Journal Biotechnology*, v. 37, n. 1, p. 11-22, 1994.
- GOWTHAMAN, M. K., GHILDYAL, N. P., RAGHAVA RAO, K. S. M. S., KARANTH, N. G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermenters: the effect of gaseous concentration gradients. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 56, p. 233239, 1993.
- GRAJEK, W. Production of D-xylanase by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 5, p. 353-356, 1987.
- GRAJEK, W. Production of protein by thermophilic fungi from sugar-beet pulp in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 255-260, 1988.
- HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, v. 58, p. 137-161, 1996.

- IKASARI, L., MITCHELL, D. A. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 171-175, 1996.
- IKASARI, L., MITCHELL, D. A. Oxygen uptake kinetics during solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. *Biotechnology Techniques*, v. 12, n. 2, p. 171-175, 1998.
- IMRIE, F. K. E., TILBURY, R. H. Polysaccharides in sugar cane and its products. *Sugar Technol. Rev.*, v. 1, p. 291-361, 1972.
- JAIN, A. Production of xylanase by thermophile *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochemistry*, v. 30, n. 8, p. 705-709, 1995.
- 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, p. 225-228, 1998.
- KALOGERIS, E., CHRISTALOPOULOS, P., KEKOS, D., MACRIS, B. J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology*, v. 60, p. 155-163, 1998.
- KESKAR, S. S. High activity xylanase from thermotolerant *Streptomyces Ti* cultural conditions and enzyme properties. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 6, p. 481-486, 1992.
- KHANDKE, K. M., VITHAYATHIL, P. J., MURTHY, S. K., Degradation of larchwood xylan by enzymes of a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 257, n. 2, p. 501-510, 1989.
- KIN, J. H., HOSOBUCHI, M., KISHIMOTO, M., SEKI, T., YOSHIDA, T., TAGUCHI, H., RYU, D. Y. Cellulase production by solid-state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 7, p. 1745-1450, 1985.

- KUMAR, P. K. R., LONSANE, B. K. Batch and fed batch solid-state fermentation: kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production, and gibberellic acid production. *Process Biochemistry*, p. 43-47, 1988.
- KUMAR, P. K. R., LONSANE, B. K. Extraction of gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, october, p. 139-143, 1987.
- KUMARAN, S., SATUY, C. A., VIKENEWAIAY, S. Laccase, cellulase, xylanase activities during growth of *Pleurotusajor-caju* on sago hampas. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 13, p. 43-49, 1997.
- LIN, S. F., HU, H. M., INUKA, T., TSAI, Y. C. Production of novel oligosaccharide oxidase by wheat bran solid-state fermentation. *Biotech. Adv.*, v. 11, p. 417-427, 1993.
- LIN, S. F., CHIOU, C. M., TSAI, Y. C. Purification and characterization of a glycerol oxidase from *Penicillium* sp TS-622. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 388-387, 1996.
- LONSANE, B. K., KRIAHNAIAH, M. M. Product leaching and downstream processing. In: Doelle, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (eds), *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier, London, p. 147-153, 1992.
- LONSANE, B. K., SAUCEDO-CASTANEDA, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINJEGRA-GONZALEZ, G., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 259-273, 1992.
- LONSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, p. 258-265, 1985.

- LU, M. Y., MADDOX, I. S., BROOKS, J. D. Application of a mult-lauer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 2, p. 117-123, 1998.
- MACHUCA, A. *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos do crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. Dissertação de Mestrado, I.B., UNICAMP, Campinas, S.P., 1991.
- MAIORANO, A. E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado, E. P., USP, São Paulo - SP, 1990.
- MAIORANO, A. E., BONOMI, A., SCHMIDELL, W., OGAKI, Y., Determinação do crescimento celular em fermentações em estado sólido. Publicação IPT, 1996.
- MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A. Biomass determination solid state cultivation. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (Eds.), *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London, p. 53-63, 1992.
- MITCHELL, D. A., LONSANE, D. K. Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (Eds.), *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London, p.1-16, 1992.
- MUDGETT, R. E. Solid-state fermentations. In *MANUAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, ed. A. L. DEMAIN & N. A. SOLOMON. American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.
- MURTHY, M. V. R., KARANTH, N. G., RAOT, K. S. M. S. R. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 38, p. 99-147, 1993.

- NANDAKUMAR, M. P., THAKUR, M. S., RAGHA VARÃO, K. S. M. S., GHILDYAL, N. P. Substrate particles size reduction by *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 121-125, 1996.
- NIGAN, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology*, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.
- OOIJKAAS, L. P., TRAMPER, J., BUITELAAR, R. M. Biomass estimation of *coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 480-486, 1998.
- PALLARES, J., RODRIGUES, A., SANROMÁN, A. Citric acid in submerged and solid-state culture of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*, v. 15, p. 31-33, 1996.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 1, p. 43-46, 1996.
- PRIOR, B. A., DU PREEZ, J. C., REIN, P. E. Environmental parameters. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (Eds.), *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier, London, p. 65-85, 1992.
- PURKARTHOFER, H., SINNER, M., STEINER, W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 677-682, 1993.

- RAIMBAULT, M. General and Microbiological aspects of solid substrate fermentation. In: International Training Course Solid State Fermentation - FMS 97, Curitiba, PR, 6-10 out. 1997.
- RAMADAS, M., HOLST, O., MATTIASSOM, B. Production of amyloglucosidase by *aspergillus niger* under different cultivations regiments. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 12, p. 267-271, 1996.
- ROCHE, N., DESGRANGES, C., DURAND, A Study on the solid-state production of a thermostable arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp. Journal of Biotechnology, v. 38, p. 43-50, 1994.
- ROUSSOS, S. Continuous enzymes and fungal metabolites production in solid state fermentation using a counter-current reactor. In: International Training Course Solid State Fermentation - FMS 97, Curitiba, PR, 6-10 out. 1997.
- SILMAN, R. W. Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. Biotechnology and Bioengineering, v. 22, p. 411-420, 1980.
- SILVA, D. J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.
- SOLIS-PEREYRA, S., FAVELA-TORRES, E., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., ROUSSOS, S., SAUCEDO-CASTANEDA, G., GUNASEKARAN, P., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation at high initial glucose concentrations. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 12, p. 257-260, 1996.
- SONNLEITNER, B., FIECHTER, A Advantages of using thermophiles in biotechnological process: expectations and reality. Trends in Biotechnology, v. 1, n. 3, p. 74-80, 1983.

- STUTZENBERGER, F. Extracellular enzyme production by *Thermomonospora curvata* grown on bagasse. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 13, p. 35-42, 1994.
- TAN, L. U. L., AMYERS, P., SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiol.*, v. 33, n. 8, p. 689-692, 1987.
- THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação semi-sólida com especial referências às celulases. *Anais do II Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, v. 1, p. 107-131, 1985.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, v. 13, p. 42-43, 1956.
- WEILAND, P. Principles of solid-state fermentation. In: ZADRAZIL, F., REINIGER, P. eds. *Treatment of Lignocellulosics with white rot fungi*, London: Elsevier Applied Science, p. 64-89, 1988.
- WIACEK-ZYCHLINSKA, A., CZAKAJ, J., SAWICKA-ZUKOWSKA, R. Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentations. *Bioresource Technology*, v. 49, p. 13-16, 1994.
- WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER, J. N. Multiplicity of xylanase in microorganisms: functions, properties and applications. *Microbiology Reviews*, v. 52, n. 13, p. 305-317, 1988.
- YU, E. K. C., TAN, L. U. L., CHAN, M. K. H., DESHATELETS, L., SADDLER, J. N. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, p. 16-24, 1987.
- ZENTGRAF, B. Enzymes from thermophiles. *Acta Biotechnology*, v. 12, n. 5, p. 377-382, 1992.





