

---

**Ciências Biológicas**

---

**JULIANA MAÍRA FREITAS VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO E ESCALONAMENTO DA  
PRODUÇÃO DE XILANASES POR *CANDIDA  
DAVISIANA* L101 ISOLADA DE AMOSTRA DA  
ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL**

Rio Claro  
2015

Juliana Maíra Freitas Vieira

OTIMIZAÇÃO E ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE  
XILANASES POR CANDIDA DAVISIANA L101 ISOLADA DE  
AMOSTRA DA ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,  
para obtenção do grau de Bacharela e  
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2015

547.758    Vieira, Juliana Máira Freitas

V658o        Otimização e escalonamento da produção de Xilanases por *Candida davisiana* L101 isolada de amostra da Antártica visando a aplicação na produção de biocombustível / Juliana Máira Freitas Vieira. - Rio Claro, 2015

47 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Lara Durães Sette

1. Enzimas. 2. Levedura. 3. Psicrotolerante. 4. Plackett & Burman. 5.  
Hidrólise enzimática. 6. Etanol de segunda geração. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **ERRATA**

O trabalho deveria conter a parte de escalonamento da produção de xilanases por *Candida davisiana* L101 isolada de amostra da antártica, porém houve contratempos durante o planejamento experimental e mudanças no objetivo que levaram a não realização desta parte do trabalho.

## **AGRADECIMENTO**

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lara Durães Sette e todos os membros do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) me apoiaram e aconselharam tornando esse trabalho possível.

A FAPESP a qual meu projeto está vinculado ao seu projeto “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações” com início em 2014.

Aos meus amigos e familiares, principalmente ao Matheus que me apoiou e ajudou todas as vezes que precisei.

## RESUMO

A crescente busca de fontes renováveis de energia impulsionou a produção do etanol. A produção deste gera uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos que podem ser aproveitados e transformados no etanol de segunda geração. Para a obtenção deste bioetanol um dos métodos que pode ser utilizado é o emprego de enzimas hemicelulósicas provenientes de leveduras, como a enzima xilanase. A hidrólise com o uso da enzima xilanase é um processo de baixo custo e que evita a formação de compostos tóxicos para uma fermentação alcoólica subsequente, método que pode ser utilizado para a produção do etanol de segunda geração e agregar valor a este. A levedura *Candida* sp. L101 é uma levedura psicrotolerante (da Antártica) produtora da enzima xilanase, com uma possível atividade específica alta, atuando em temperaturas baixas e moderadas. Neste trabalho é demonstrada a determinação da produção de xilanases pela *Candida* sp. L101 através da estimativa da liberação de açúcares (método do ácido dinitrosalicílico - ADNS) e avaliação da influência de diferentes fatores na produção desta (delineamento experimental de Plackett&Burman) visando sua otimização. Os resultados obtidos após sete planejamentos do tipo Plackett&Burman e caracterização prévia das xilanases, produzidas por *Candida* sp. L101, demonstraram uma boa estabilidade da enzima em baixas e médias temperaturas (perca de estabilidade a partir de 35°C), boa faixa de pH de atuação (pH 3 a 7) e um aumento de aproximadamente 38 vezes (22,6 uMol/mL/Min) em relação a produção obtida inicialmente, demonstrando eficácia na técnica de planejamento experimental utilizada. A levedura *Candida* sp. L101 não produziu no presente trabalho quantidades elevadas de xilanases se comparada com fungos filamentosos, mas apresentou características interessantes e potencial para ainda melhoras em sua produção enzimática, indicando ser um promissor recurso genético para a produção de xilanases e futura aplicação na produção de bioetanol.

**Palavras-chave:** Levedura; Hidrólise enzimática; Psicrotolerante; Etanol de segunda Geração.

# SUMÁRIO

|                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                               | <b>6</b>  |
| 1.1. Introdução às leveduras                                                                                       | 6         |
| 1.2. A importância das leveduras                                                                                   | 6         |
| 1.3. Xilanases                                                                                                     | 8         |
| 1.4. Biocombustível, Xilanases e <i>C. davisiana</i> L101                                                          | 9         |
| 1.5. Planejamento Experimental                                                                                     | 14        |
| <b>2. OBJETIVO</b>                                                                                                 | <b>15</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                      | <b>16</b> |
| 3.1. Micro-organismo                                                                                               | 16        |
| 3.2. Preparo do inóculo                                                                                            | 16        |
| 3.3. Obtenção do caldo enzimático                                                                                  | 17        |
| 3.4. Curva padrão de xilose                                                                                        | 17        |
| 3.5. Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de xilanase e liberação de açúcares fermentescíveis | 17        |
| 3.6. Determinação da atividade xilanolítica                                                                        | 18        |
| 3.7. Análise dos dados                                                                                             | 18        |
| 3.8. Caracterização das Xilanases                                                                                  | 19        |
| 3.8.1. Melhor temperatura e tempo de reação enzimática                                                             | 19        |
| 3.8.2. Faixa de pH de reação enzimática                                                                            | 19        |
| 3.8.3. Estabilidade térmica                                                                                        | 19        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                   | <b>20</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                                                                                     | <b>40</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                                                                                               | <b>40</b> |
| <b>5. ANEXOS</b>                                                                                                   | <b>45</b> |
| 5.1. Anexo 1 - Matriz Codificada Plackett & Burman - 19 ensaios                                                    | 45        |
| 5.2. Anexo 2 –Matriz Codificada Plackett & Burman - 16 ensaios                                                     | 45        |
| 5.3. Anexo 3 – Matriz Codificada Plackett & Burman - 20 ensaios                                                    | 46        |
| 5.4. Anexo 4 - Matriz Codificada Plackett & Burman - 12 ensaios                                                    | 46        |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Introdução às leveduras**

As leveduras são organismos eucariontes e fazem parte do reino Fungi, um grupo grande e diversificado, composto por fungos filamentosos e leveduras. Os fungos habitam ambientes diversos como os aquáticos, de água doce ou marinha, os terrestres (em sua maioria) podendo habitar ambientes extremos como a Antártica (MADIGAN *et al.*, 2010).

As leveduras se encontram dentro do reino Fungi cujos principais gêneros de interesse são *Saccharomyces*, *Candida* e *Neurospora* (MADIGAN *et al.*, 2010). Representantes do gênero *Saccharomyces* são os mais conhecidos, sendo amplamente utilizados em processos industriais como a produção de pão e cerveja (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Na natureza, as leveduras normalmente são encontradas associadas a vegetais, insetos, húmus e outros substratos, sendo capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono, apesar de geralmente ter preferência por utilizar glicose, frutose ou manose (MELO, 2006).

As leveduras em sua maioria são aeróbias facultativas, capaz de realizar o metabolismo aeróbio como o fermentativo e suas células, em geral, são muito maiores do que as células bacterianas, o que possibilita a distinção microscópica dos procariotos, além de apresentarem estruturas celulares internas, como núcleo e vacúolos citoplasmáticos (MADIGAN *et al.*, 2010).

### **1.2. A importância das leveduras**

Há séculos as leveduras vêm trazendo diversos benefícios à humanidade, desde usos tradicionais para obtenção de alimentos a partir de processos fermentativos, bem como em áreas mais específicas incluindo a medicina e a biotecnologia. As leveduras em sua maioria são aeróbias facultativas, capaz de realizar o metabolismo aeróbio como o fermentativo e suas células, em geral, são muito maiores do que as



células bacterianas, o que possibilita a distinção. Este grupo de micro-organismos vem sendo relacionado a uma das melhores associações entre o progresso e o bem-estar do homem, as quais são atribuídas ao fato de oferecerem uma rápida conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono (STEWART, 1986).

Apesar dos benefícios, as leveduras podem apresentar malefícios. Como estes micro-organismos vivem nos mais diversos habitats, onde há presença de matéria orgânica ou como parasitas, há casos de leveduras relacionadas a doenças humanas. Muitas patologias, como infecções na pele e mucosas (boca e olhos), estão relacionadas às leveduras, bem como doenças sexualmente transmissíveis. A mais conhecida é a candidíase, causada pela levedura *Candida albicans*, que afeta principalmente a genitália feminina (VARELLA, 2015).

O rápido crescimento da população global tem aumentado a demanda por uma maior produção de alimentos, combustíveis e energia (GOLDEMBERG, 2008). Com isso, setores da biotecnologia tem investido em meios para acompanhar a alta produção exigida. Subáreas, que utilizam leveduras, como fermentação tradicional (cerveja, vinho, molhos, alimentos produzidos a partir da fermentação), biotecnologia de alimentos (enzimas, aromatizantes, pigmentos), biocatálise (biotransformações, fármacos), produção proteica (proteínas farmacêuticas, enzimas, hormônios), pesquisa biomédica (metabolismo e resistência de fármacos, mecanismos de esclarecimento de doenças), biocontrole (proteção de culturas, segurança de alimentos) e biotecnologia ambiental (biorremediação e degradação de poluentes) estão em alta, na procura da melhoria da qualidade de vida (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Outras áreas de estudos frequentes de leveduras são as que envolvem energia e suas fontes, pois necessitam não apenas de melhorias, mas também de meios alternativos de obtenção. Por exemplo, o limite de reservas de petróleo demanda a busca por meios viáveis para produção de combustíveis, incentivando as pesquisas relacionadas com a produção de bioetanol.

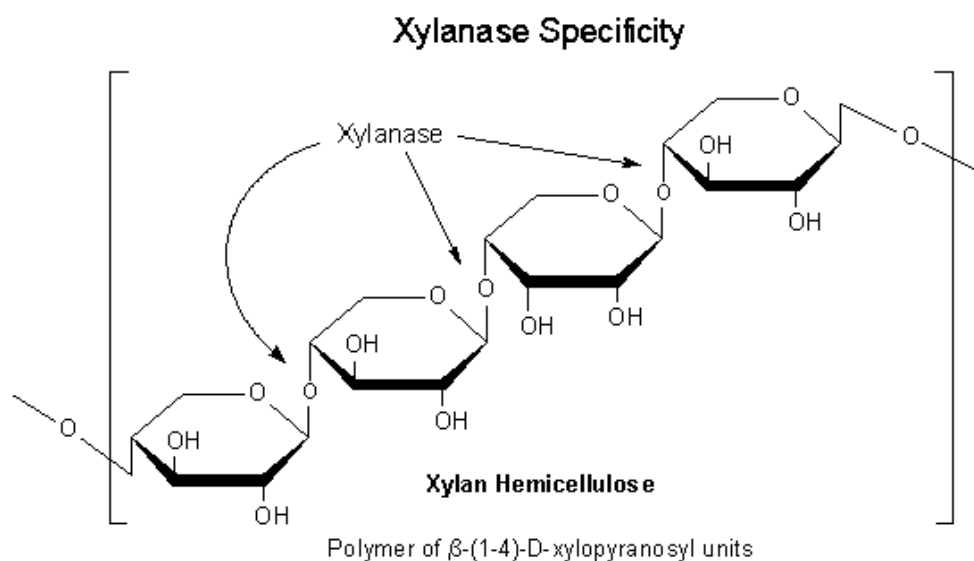
Na obtenção do bioetanol a produção de enzimas lignocelulósicas por micro-organismos tem sido alvo de estudos, visando obter novos recursos genéticos capazes de degradar o material lignocelulósico, facilitando o acesso à celulose e aumentando a concentração de açúcares fermentescíveis. Neste contexto, as xilanases produzidas por leveduras possuem papel de destaque.

### 1.3. Xilanases

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são a celulose (40-50%), a hemicelulose (15-30%) e a lignina (10-30%), sendo a hemicelulose o segundo componente mais abundante na madeira e nos resíduos agrícolas. A maior classe de hemiceluloses é a xilana, a qual está localizada na matriz da parede celular da célula vegetal, exercendo uma função adesiva mediada por interações covalentes e não-covalentes com a lignina, a celulose e outros polímeros essenciais para a manutenção e integridade da parede celular (MEDEIROS, 2007).

As hemiceluloses são polissacarídeos compostos por cadeias de diferentes pentoses ou hexoses unidas por ligações  $\beta$ -(1-4) (Figura 1). Devido a complexidade e heterogeneidade, a degradação das hemiceluloses requer uma variedade de enzimas atuando em conjunto (NUNES, 2010).

**Figura 1.** Polímero de Xilana e atuação das xilanases (Fonte: *Figurade Sigma-Aldrich*).



As enzimas que atuam na cadeia principal das xilanas são as  $\alpha$ -1,4-xilosidases e as  $\alpha$ -1,4-xilanases ou simplesmente xilanases. As xilanases são produzidas por diversos organismos, como bactérias, fungos, algas, protozoários e artrópodes. Estas enzimas são capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia principal de xilana gerando xilo-oligômeros de tamanhos variados. Muitas bactérias e fungos podem secretar xilanases que atuam sobre o material hemicelulósico liberando como produto final o açúcar xilose diretamente assimilável, o que permite ao organismo crescer de forma heterotrófica na xilana (VIEIRA, 2003).

As hemicelulases, como a xilanase, podem ser aplicadas em uma ampla gama de processos industriais, tais como branqueamento enzimático de pasta de papel, extração de suco de frutas, remoção de sedimentos, produção de café solúvel e na fabricação de pães e rações de animais (BRADNER, 1999).

#### **1.4. Biocombustível, Xilanases e *C. davisiana* L101**

A bioenergia, em suas diferentes formas, foi a principal e, as vezes, a única forma de suprimento energético exógeno utilizada pelo homem ao longo de sua história. Desde as primitivas fogueiras há mais de 500 mil anos, a biomassa lenhosa foi a fonte energética por excelência que cobria as necessidades e supria os primitivos sistemas de iluminação. Só no século XVIII, quando ocorreu a exaustão das reservas de lenha disponíveis em boa parte da Europa Ocidental, foi iniciada a exploração do carvão mineral que posteriormente foi substituído pela exploração do petróleo. Se não houvesse sido introduzida a energia fóssil a história moderna certamente teria tido outro percurso (BNDES E CGEE, 2008).

De modo geral, os sistemas bioenergéticos apresentam uma marcada dicotomia entre dois casos. No primeiro, encontram-se os sistemas tradicionais, praticados há milhares de anos, nos quais a exploração dos recursos de biomassa se faz em bases extrativistas, como a utilização de lenha. E como segundo caso, encontram-se os sistemas inovadores e modernos de bioenergia, em que a produção

ocorre visando atender às necessidades de energia da indústria moderna, do setor de transporte e na geração de eletricidade, como as cadeias bioenergéticas do bioetanol de cana-de-açúcar, do biodiesel de palma ou de sebo, da bioeletricidade produzida com bagaço, licor negro entre outros (BNDES e CGEE, 2008).

No amplo contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos tem sido considerada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. Durante a segunda metade do século XIX, os biocombustíveis representavam a fonte de energia preferencial para os motores de combustão interna, mas foram substituídos à medida que os combustíveis derivados de petróleo passaram a ser abundantes e baratos (BNDES e CGEE, 2008).

O biocombustível corresponde a um combustível, líquido ou gasoso, produzido a partir de recursos naturais, em sua maior parte produzidos diretamente de biomassa (matéria orgânica renovável). Um dos principais produtos deste processo e de grande importância, tanto ambiental quanto econômica, é o etanol (FERREIRA, 2015).

A busca pelo desenvolvimento mundial de biocombustíveis tem sido cada vez maior uma vez que auxilia a redução da emissão dos gases relacionados ao efeito estufa. Além do mais, esta fonte de energia é uma alternativa às futuras restrições ligadas ao petróleo, sendo este um recurso finito devido à sua origem fóssil. Por outro lado, para que a demanda necessária seja suprida, extensas áreas de cultivo são necessárias. A solução para essa adversidade é o investimento em pesquisas para desenvolvimento biotecnológico de processos que utilizem como fonte de produção de biocombustível a biomassa dos resíduos lignocelulósicos (FERREIRA, 2015).

Os resíduos lignocelulósicos podem ser classificados em seis grupos principais: resíduos de colheitas (palha de milho, sabugo de milho, cascas de arroz, cascas de cevada, palha de centeio, palha de aveia, palha de arroz, palha de trigo, talos de milho, hastes de algodão, talos de soja, bagaço de cana), madeiras duras (eucalipto, acácia, álamo), madeiras macias (Salix, abeto, pinho), resíduos de celulose (jornal, resíduos de papel de escritório, papel reciclado), biomassa

herbácea (caules de alfafa, capim), e resíduos sólidos urbanos (BURUIANA, 2013).

Estes resíduos são gerados pelo setor agrícola e naturalmente em processos ambientais, como em florestas, e o etanol produzido a partir da biomassa de resíduos é chamado de bioetanol de segunda geração (FERREIRA, 2015).

Economicamente, a produção de etanol torna os países menos dependentes da importação de petróleo e assim, alavanca o mercado e capital interno. Um exemplo claro é a criação do Proálcool, na década de 1970 no Brasil, que tinha o intuito de tornar o país menos dependente da importação de petróleo. Nas últimas décadas, vários países estão tomando medidas que buscam a maior produção de bioetanol associada a uma redução de custos, o que é vantajoso, visando o menor preço do combustível. Os Estados Unidos, por exemplo, investem na obtenção do recurso a partir do milho, justificando a adição de aditivos na gasolina. Enquanto que países na Europa Ocidental produzem etanol a partir de açúcares extraídos do trigo e da beterraba. Ainda assim, os países citados anteriormente se deparam com um custo no valor do etanol de duas a quatro vezes maior do que no Brasil (GOLDEMBERG, 2008).

Nosso país apresenta um crescimento e facilidade na produção de culturas geradoras de resíduos viáveis para a produção de etanol de segunda geração. Fatores como a facilidade de cultivo, que reduz os custos com o manuseio e manutenção, e a utilização de pastagem para o cultivo são essenciais para a produção do bioetanol, além da importância no aspecto ambiental. O fato do Brasil se destacar como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, produzindo imensas quantidades de resíduos agroindustriais, é o que causa a redução dos custos na obtenção de biomassa (FERREIRA, 2015).

Mas para que o bioetanol seja consolidado como combustível do futuro ele precisa passar pelo desafio de aumentar ainda mais a sua produtividade, sem aumentar o seu custo, e de forma que suas culturas não avancem sobre outras culturas agrícolas, o que impactaria a produção de alimento (GONÇALVES, 2010).

Atualmente, a maior justificativa para a produção do bioetanol de segunda geração, além da redução de custos, é evitar a competição pelo uso da terra para gerar energia e para produzir alimentos, com ênfase em locais que não dispõem de condições favoráveis, como clima e extensa área de cultivo, sendo de suma importância o investimento e crescimento de pesquisas relacionadas a produção do bioetanol de segunda geração (FERREIRA, 2015).

A eficiência na utilização dos açúcares presentes em matérias-primas é pré-requisito para um processo economicamente viável de produção de bioetanol, e pequenos aumentos na captação e transformação desses substratos podem melhorar significativamente o processo (FERREIRA, 2010).

A produção de etanol a partir da biomassa requer geralmente um processo de pré-tratamento, no qual ocorre a quebra da hemicelulose e liberação de estruturas dos componentes da celulose, esta então é hidrolisada por enzimas e os açúcares liberados são fermentados à etanol. Porém, o açúcar da hemicelulose é fermentado de forma pouco eficiente e a lignina é queimada como combustível para alimentar o processo. Uma das formas de se aperfeiçoar essa produção é a utilização da hidrólise da hemicelulose liberando uma maior quantidade de pentoses (BRUSTULIN; CARREIRO, 2013).

As xilanases hidrolisam a cadeia glicosídica da xilana contida na superfície da polpa facilitando a extração da lignina, sem danificar a celulose (VIEIRA, 2003). Deste modo, o intuito de se usar a xilanase é substituir, ou diminuir, a utilização de pré-tratamentos.

É essencial ter um biocatalisador capaz de fermentar hexoses e pentoses sob as condições adversas do ambiente. A habilidade de leveduras em fermentar xilose tem sido descrita desde os anos 80, quando du Preez e colaboradores reportaram a *Candida shehatae* como uma levedura fermentadora de xilose (MOURO, 2012).

Leveduras capazes de produzir enzimas hemicelulósicas e de utilizar pentoses como fonte de carbono e energia, podem ser úteis nos processos de obtenção de etanol de segunda geração, agregando valor à produção deste a partir de resíduos lignocelulósicos. A celulose

presente em resíduos agrícolas e agro-industriais pode ser hidrolisada enzimaticamente pela ação destes micro-organismos para a geração de açúcares fermentescíveis utilizados na produção de etanol celulósico (DELABONA, *et al.* 2009).

Atualmente, há uma grande busca de processos para a hidrólise do bagaço a açúcares fermentescíveis, que sejam de baixo custo e ao mesmo tempo evitem formação de compostos tóxicos para a fermentação alcoólica subsequente. O uso de enzimas microbianas como celulasas e xilanases atende a essas exigências (SILVA, 2010).

No âmbito do projeto “Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica (Fapesp 2010/17033-0) coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette, foi realizado uma triagem de 90 leveduras isoladas (pelo nosso grupo de pesquisa) a partir de amostras marinhas e terrestres do ecossistema antártico, das quais 37 apresentaram resultado positivo de produção de xilanase em meio sólido (presença de halo). Destas, 15 produziram halo de hidrólise de xilana  $\geq 30$  mm a 15°C e foram pré-selecionados para as análises posteriores de determinação da atividade xilanolítica em meio líquido.

Os resultados da atividade xilanolítica em meio líquido revelaram que 5 leveduras foram capazes de produzir xilanase em quantidade  $\geq 0,3$  U/mL a 15°C e a maior atividade foi detectada pela levedura *Candida davisiana* L101. Estudos posteriores revelaram que este micro-organismo é capaz de produzir xilanase a 20°C, 15°C, 10 °C e a 5°C. Neste contexto, o presente trabalho está associado ao Projeto Fapesp2013/19486-0 intitulado “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações” e teve como objetivo otimização da produção das enzimas xilanases, pela levedura da Antártica *C. davisiana* L101, para subsequente avaliação de aplicação das mesmas na produção de etanol celulósico.

As enzimas adaptadas ao frio possuem alta atividade específica em temperaturas baixas e moderadas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica (SIDDIQUI e CAVICCHIOLI, 2006). Mais recentemente, o estudo destas enzimas tem

sido estimulado visando diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial (GERDAY *et al.*, 2000).

Uma importante característica destas enzimas é a correlação da alta atividade catalítica e a estabilidade térmica a temperaturas baixas, que pode ser parcialmente explicado pelo aumento da flexibilidade da molécula, em comparação com enzimas mesófilas e termófilas (GEORLETTE *et al.*, 2004; SIDDIQUI e CAVICCHIOLI, 2006). A maior flexibilidade das enzimas adaptadas a baixas temperaturas é devido à menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto nestas proteínas em comparação aos homólogos de micro-organismos mesófilos (GOMES e STEINER, 2004; SIDDIQUI e CAVICCHIOLI, 2006).

A compreensão das relações entre a estabilidade térmica, flexibilidade e eficiência catalítica das enzimas adaptadas ao frio é de fundamental importância para uma posterior aplicação destas no setor biotecnológico e posteriores experimentos de mutagênese direcionada, complementada por evolução dirigida, buscando-se uma otimização da biocatálise por psicrófilos (GEORLETTE *et al.*, 2004; D'AMICO *et al.*, 2006). Entretanto, a taxonomia, ecologia, bioquímica e fisiologia dos organismos psicrófilos estão em fase inicial de investigação, o que torna os micro-organismos associados ao ambiente Antártico promissores no setor biotecnológico (GERDAY *et al.*, 2000; GOMES e STEINER, 2004).

Cabe destacar que a *C. davisiana* é uma espécie de levedura oficialmente não descrita, portanto, o presente trabalho irá se referir à mesma como *Candida* sp. L101. Também, o fato desta levedura se tratar de uma espécie nova e do continente antártico pode ser vantajoso, pois por pode apresentar propriedades específicas e diferentes das espécies conhecidas.

### **1.5. Planejamento Experimental**

Atualmente no Brasil, os recursos financeiros e laboratoriais encontram-se escassos em decorrência das restrições de verbas, demandando cada vez mais que a pesquisa científica estabeleça condições experimentais com as quais se obtenham resultados



confiáveis e uma otimização de parâmetros experimentais, principalmente quando se visa uma aplicação em grande escala (CUNICO, M. W. M. *et al.*, 2008).

O termo otimização significa a melhora do desempenho de um sistema, processo ou produto. Esta otimização pode ser realizada utilizando-se uma variável por vez, ou seja, há a variação de um fator enquanto se mantém os demais constantes. Porém, ao se utilizar esta estratégia, se gera um maior número de ensaios, e conseqüentemente, uma maior demanda de reagentes e tempo, além de que não permite o estudo dos efeitos da interação entre as variáveis (NOGUEIRA *et al.* 2015).

Para resolver este problema é possível empregar técnicas de estatística multivariada, mais conhecidas como planejamentos experimentais. Há vários tipos de planejamentos experimentais, mas o melhor indicado para um primeiro planejamento é o do tipo Plackett&Burman.

O modelo Plackett&Burman é um planejamento experimental utilizado com o propósito de *screening*, pois possibilita a análise de um maior número de fatores (variáveis). Por exemplo, um Plackett&Burman com 36 ensaios pode ser aplicado a um estudo com 33 fatores, ao invés dos 64 ensaios necessários para um planejamento fatorial regular fraccionado com o mesmo número de fatores. Ao usar este projetos, se supõe que apenas um pequeno número de fatores estão ativos, e que todos os termos de interação são desprezíveis. Isto é conhecido como efeito de esparsidade. (QUINLAN & LIN, 2015).

## 2. OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo principal avaliar a influência de diferentes fatores na produção de xilanase pela levedura *Candida* sp. L101 por meio de desenho experimental, visando otimização de sua produção e breve caracterização da enzima produzida.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Micro-organismo

No presente trabalho foi utilizada a levedura *Candida* sp. L101 (Figura 2), isolada de amostra de rocha com líquen, coletada no continente antártico na expedição de março de 2010 (Punta Plaza) por Fernando Suzigan Nobre. Esta levedura foi previamente selecionada como a melhor produtora de xilanase em meio líquido no âmbito do projeto Fapesp 2010/17033-0 pela doutoranda Ifeloju Dayo-Owoyemi. A levedura foi identificada durante o Doutorado de Alysson W. F. Duarte (Duarte *et al.*, 2013) e está sendo mantida nas coleções de pesquisa associadas à Coleção Brasileira de micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP e na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

**Figura 2.** Levedura isolada da Antártica *Candida* sp. L101



(*Candida* sp. L101. Meio SAB. 5 dias\_100x)

#### 3.2. Preparo do inóculo

A levedura, *Candida* sp. L101, foi cultivada em meio Sabouraud por 4-5 dias e então inoculada em meio Starvation (Yeast Nitrogen base 0,67%; Glicose 0,1%) por três dias para posterior contagem de células, por câmara de Neubauer, e inoculação nos diferentes meios do planejamento experimental.

### **3.3. Obtenção do caldo enzimático**

Foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,5 mL dos meios de cultivo do planejamento experimental, as quais foram centrifugadas em Mini-spin por 5 minutos a 10.000 rpm para separação do caldo enzimático (sobrenadante) e resíduos do meio. Quando necessário as alíquotas foram armazenadas em eppendorfs em freezer (-20°C).

### **3.4. Curva padrão de xilose**

Para a determinação da curva padrão de xilose a ser utilizada no trabalho foi realizada uma solução padrão de xilose 0,005M (7,5 mg de xilose em 10 mL de água destilada). A partir desta solução foram feitas 9 diluições. Para obtenção da solução mais concentrada pipetou-se 100 µL da solução padrão, a partir daí foram pipetados 10 µL a menos da solução padrão para cada diluição (90 µL, 80 µL, 70 µL, 60 µL, 50 µL, 40 µL, 30 µL, 20 µL, 10 µL) e completou-se com água destilada para 100 µL.

A quantificação das soluções se deu por meio da estimativa da liberação de açúcares utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (Miller, 1959) e então foi elaborado um gráfico relacionando absorbância e concentração de açúcar (mg/mL), no qual foi obtido a linha de tendência e a equação da reta.

### **3.5. Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de xilanase e liberação de açúcares fermentescíveis**

A levedura foi submetida à avaliação de diferentes fatores na produção enzimática por meio de delineamentos experimentais utilizando o modelo de Plackett&Burman (PB). No estudo estatístico foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: diferentes fontes de C e N, diferentes pH, indutores e quantidade de inóculo, conforme matriz do planejamento que foi montada utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

### 3.6. Determinação da atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica foi determinada usando 80 µL de uma solução de xilana 1% em tampão acetato de sódio pH 5.6, como substrato, e 20 µL do caldo enzimático obtido por centrifugação. Quando necessário foi realizada a diluição prévia do caldo enzimático em tampão acetato de sódio pH 5.6.

A reação enzimática foi realizada a 40°C por 15 minutos e sua quantificação se deu por meio da estimativa da liberação de açúcares utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959), com as leituras de absorbância realizadas a 540nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de xilose por minuto por mL de caldo enzimático (bruto), de acordo com a curva padrão de xilose.

Foi utilizada a seguinte formula para a conversão de valores:

$$U = \frac{1}{\epsilon} * \frac{V_r}{V_e} * \frac{1}{T} * 1000 * Abs * Diluição$$

Onde:

**U** = Unidade de atividade.

**ε** = Obtido na curva de açúcar:

$$\epsilon = a * Massamolardaxilose$$

*a = a da reta da curva padrão de xilose*

**V<sub>r</sub>** = Volume da reação (tampão + caldo enzimático), em µL.

**V<sub>e</sub>** = Volume pipetado do caldo enzimático, em µL.

**T** = tempo da reação enzimática, em minutos.

**Abs** = Média da absorbância das réplicas.

### 3.7. Análise dos dados

Os dados obtidos a partir dos desenhos experimentais do tipo PB foram analisados estatisticamente utilizando o programa STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

### **3.8. Caracterização das Xilanases**

#### **3.8.1. Melhor temperatura e tempo de reação enzimática**

Para a determinação da melhor temperatura de reação enzimática o caldo enzimático da condição otimizada foi submetido a duas temperaturas diferentes (40°C e 45°C) e as amostras foram deixadas por 5, 10, 15, 20 e 25 minutos à 40°C e 5,10,15 e 20 minutos à 45°C. A quantificação enzimática se deu como mencionada anteriormente.

#### **3.8.2. Faixa de pH de reação enzimática**

Para a determinação da melhor faixa de pH para a reação enzimática foi utilizado 20 µL do caldo enzimático e 80 µL de substrato. Para o substrato foram utilizadas soluções de xilana 1% em tampão acetato de sódio (pH 4.0, 4.6, 5.0 e 5.6), em tampão de McIlvaine (pH 3.0, 3.6, 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0) e em tampão Tris-HCl (pH 8.0 e 9.0) (MORITA e ASSUMPÇÃO,1988). Quando necessário o caldo enzimático foi diluído nos respectivos tampões.

Para a reação enzimática foi utilizado o tempo e temperatura determinados no teste de melhor temperatura e tempo de reação enzimática (40°C por 5 minutos). A quantificação enzimática se deu como mencionada anteriormente.

#### **3.8.3. Estabilidade térmica**

Para a determinação da estabilidade térmica das xilanases de *Candida* sp. L101, o caldo enzimático foi separado em alíquotas e submetido a diferentes temperaturas (5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C) durante uma hora. Amostras destas alíquotas foram retiradas a cada 10 minutos durante este período e submetidas a um banho frio, com a adição de tampão acetato de sódio pH 4.6 gelado.

As amostras diluídas foram submetidas à quantificação enzimática utilizando o método já citado, com solução de xilana 1% em tampão acetato de sódio pH 4.6 (como substrato) e a reação enzimática realizada a 40°C por 5 minutos.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Previamente à condução do presente trabalho foram testadas diferentes temperaturas (5°C, 10°C, 15°C, 20°C e 25°C) durante 230 horas (com medições a cada 24h, sendo a temperatura de 20°C a melhor para produção de xilanases por *Candida* sp. L101. Com essa variável definida foi possível iniciar o trabalho de definição da melhor velocidade de rotação a ser utilizada nesta condição e, entre 150 rpm e 200 rpm, os resultados obtidos indicaram ser 150 rpm a melhor. Deste modo, estes valores foram fixados para a condução do desenho experimental.

Antes de dar início ao planejamento experimental foi realizado um experimento com as condições iniciais (rotação de 150 rpm a 20°C) para que se pudesse comparar os resultados obtidos antes e após a aplicação do planejamento experimental (efeitos das diferentes variáveis estudadas) em função do aumento da quantidade de enzima produzida, com vistas à obtenção da otimização do processo produtivo.

Nestes experimentos iniciais também foram realizados novamente experimentos de cinética, para encontrar o melhor tempo de produção enzimática, bem como foi comparada a utilização dos reagentes do laboratório onde primeiramente a produção foi testada (Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS) e no laboratório onde o projeto foi desenvolvido (Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial –LAMAI).

Os resultados demonstraram uma melhor produção com os reagentes do LAMAI e definiu-se, então, sua utilização como o melhor para a produção de xilanases (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101, à 150 rpm e 20°C em diferentes tempos comparando-se os reagentes dos laboratórios (LAMAI e CEIS).

|                  | LAMAI          | CEIS           |
|------------------|----------------|----------------|
|                  | (u/Mol/mL/Min) | (u/Mol/mL/Min) |
| <b>72 Horas</b>  | 0,03           | 0,03           |
| <b>96 Horas</b>  | 0,12           | 0,06           |
| <b>120 Horas</b> | 0,10           | 0,08           |
| <b>144 Horas</b> | 0,02           | 0,01           |
| <b>168 Horas</b> | 0,02           | 0,03           |

Com o melhor reagente definido, foram testadas duas metodologias de reação enzimática encontradas na literatura na qual o tempo e temperatura de reação (enzima com substrato) são diferentes. Os resultados obtidos, apresentados (**Tabela 2**), demonstraram que a metodologia que utilizou a temperatura de 40°C por 15 min foi a mais eficaz, sendo esta a metodologia adotada, bem como foi definido o tempo de 120 horas como o melhor para a produção de xilanases (0,58  $\mu$ Mol/mL/min).

**Tabela 2.** Produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101, à 150 rpm e 20°C em diferentes tempos comparando-se duas metodologias, 25°- 120 min e 40°C -15 min.

|                  | 25°C -120 min  | 40°C -15 min   |
|------------------|----------------|----------------|
|                  | (u/Mol/mL/Min) | (u/Mol/mL/Min) |
| <b>72 Horas</b>  | 0,03           | 0,34           |
| <b>96 Horas</b>  | 0,12           | 0,35           |
| <b>120 Horas</b> | 0,10           | 0,58           |
| <b>144 Horas</b> | 0,02           | 0,24           |
| <b>168 Horas</b> | 0,02           | 0,13           |

O passo seguinte foi a determinação das variáveis a serem utilizadas no primeiro planejamento experimental, a partir de uma revisão bibliográfica, utilizando o modelo de Plackett&Burman (PB). Foram escolhidas 9 variáveis independentes, resultando em 16 ensaios e três repetições no ponto central (totalizando 19 ensaios) (matriz codificada PB, **Anexo 1**).

As variáveis selecionadas foram: quantidade de inóculo, diferentes fontes de carbono (xilana, farelo de trigo), diferentes fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura e extrato de soja), indutores da atividade

enzimática ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub>) e diferentes pH. As variáveis em suas respectivas faixas de concentrações estão apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Variáveis aplicadas ao primeiro PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| Variáveis                                          | -1                        | 0                         | 1                         |
|----------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1. Xilana                                          | 0                         | 1% (0,5 g/50mL)           | 2% (1,0 g/50mL)           |
| 2. Peptona                                         | 0                         | 0,1% (0,05 g/50mL)        | 0,2% (0,10 g/50mL)        |
| 3. Extrato de levedura                             | 0                         | 0,1% (0,05 g/50mL)        | 0,2% (0,10 g/50mL)        |
| 4. Extrato de Soja                                 | 0                         | 0,1% (0,05 g/50mL)        | 0,2% (0,10 g/50mL)        |
| 5. Farelo de Trigo                                 | 0                         | 1% (0,5 g/50mL)           | 2% (1,0 g/50mL)           |
| 6. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0                         | 0,1% (0,10 g/50mL)        | 0,2% (0,10 g/50mL)        |
| 7. CaCl <sub>2</sub>                               | 0                         | 0,2% (0,10 g/50mL)        | 0,4% (0,20 g/50mL)        |
| 8. pH                                              | 4,5                       | 5,5                       | 6,5                       |
| 9. Inóculo                                         | 1x10 <sup>5</sup> células | 1x10 <sup>6</sup> células | 1x10 <sup>7</sup> células |

Nos planejamentos realizados cada ensaio recebeu uma numeração e os pontos centrais receberam a numeração e "(C)", pois representam o controle do experimento e a confiabilidade dos dados, pois é o único ensaio no qual há repetições (réplicas).

O primeiro planejamento contendo 19 ensaios, contando com três pontos centrais, foi bem sucedido resultando em 6,77 µMol/mL/Min (**Tabela 4**) no Ensaio 19(C), aumentando em aproximadamente 11,5 vezes a produção obtida anteriormente. Entretanto, o melhor resultado obtido foi no ponto central (Ensaio 19(C)), o que complicou a continuidade do planejamento, pois o ponto central possui um pouco de todas as variáveis, tornando difícil avaliar quais delas foram significativas para dar continuidade à otimização. Uma variável significativa é quando  $p \leq 0,1$ , sendo que quanto mais próximo de 0 for o valor de p obtido maior a significância da variável. Apesar disso, o planejamento apresentou variáveis negativas (efeito negativo) e positivas (efeito positivo) para a produção de xilanases (**Tabela 5**).



**Tabela 4.** Resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 no primeiro PB com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.

| Atividade Enzimática |          |        |          |
|----------------------|----------|--------|----------|
| Ensaio               | U/mL/Min | Ensaio | U/mL/Min |
| 1                    | 0,00     | 11     | 0,00     |
| 2                    | 2,40     | 12     | 0,00     |
| 3                    | 3,44     | 13     | 0,05     |
| 4                    | 1,41     | 14     | 0,00     |
| 5                    | 0,04     | 15     | 0,00     |
| 6                    | 2,71     | 19     | 0,00     |
| 7                    | 0,06     | 17 (C) | 6,45     |
| 8                    | 1,09     | 18 (C) | 1,60     |
| 9                    | 3,56     | 19 (C) | 6,77     |
| 10                   | 0,04     |        |          |

(c) = ensaio controle.

**Tabela 5.** Resultados estatísticos do primeiro planejamento experimental do tipo PB.

| Dados Estatísticos |                                                 |           |          |           |          |
|--------------------|-------------------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|
|                    | Mean/Interc.                                    | Effect    | Std.Err. | t(9)      | p        |
|                    |                                                 | 1,572902  | 0,608862 | 2,583347  | 0,029534 |
| 1                  | Xilana                                          | 0,932632  | 1,328854 | 0,701832  | 0,500529 |
| 2                  | Peptona                                         | 0,060502  | 1,328854 | 0,045530  | 0,964679 |
| 3                  | Extrato de levedura                             | -0,820725 | 1,328854 | -0,617619 | 0,552131 |
| 4                  | Extrato de Soja                                 | 0,584087  | 1,328854 | 0,439542  | 0,670634 |
| 5                  | Farelo de Trigo                                 | 0,365570  | 1,328854 | 0,275102  | 0,789449 |
| 6                  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,265024  | 1,418606 | 0,186820  | 0,855945 |
| 7                  | CaCl                                            | -0,279129 | 1,328854 | -0,210052 | 0,838305 |
| 8                  | pH                                              | -0,305836 | 1,328854 | -0,230150 | 0,823121 |
| 9                  | Inóculo                                         | 1,770383  | 1,328854 | 1,332263  | 0,215522 |

Com base no efeito das variáveis foi realizado um segundo planejamento contendo sete variáveis. A quantidade de inóculo foi fixada ( $1 \times 10^6$  células), uma variável negativa foi eliminada (extrato de levedura) e as variáveis positivas foram aumentadas (xilana, farelo de trigo, peptona, extrato de soja) ou mantidas ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub>) (**Tabela 6**).

Neste planejamento foi utilizada a matriz codificada PB 12 (**Anexo 2**), aumentando sua eficácia com a adição de mais um ponto central (mais uma réplica) totalizando 16 ensaios (12 ensaios e 4 pontos centrais).

**Tabela 6.** Variáveis aplicadas ao segundo PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| Variáveis                                          | -1                 | 0                   | 1                  |
|----------------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| 1. Xilana                                          | 0                  | 2% (1,0 g/50mL)     | 4% (2,0 g/50mL)    |
| 2. Farelo de Trigo                                 | 0                  | 2% (1,0 g/50mL)     | 4% (2,0 g/50mL)    |
| 3. Peptona                                         | 0                  | 2% (1,0 g/50mL)     | 4% (2,0 g/50mL)    |
| 4. Extrato de Soja                                 | 0,1% (0,05 g/50mL) | 0,25% (0,12 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 5. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0                  | 0,2% (0,10 g/50mL)  | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 6. CaCl <sub>2</sub>                               | 0                  | 0,2% (0,10 g/50mL)  | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 7. pH                                              | 5                  | 6                   | 7                  |

Neste segundo planejamento, o melhor resultado permaneceu no ponto central (Ensaio 14C) e a produção foi reduzida em aproximadamente três vezes (2,16 uMol/mL/Min) quando comparada à obtida no primeiro PB. Como o resultado foi no ponto central, não houve variáveis significativas (**Tabela 7**). Diante desta condição, foi realizado um novo planejamento semelhante ao primeiro, mantendo as variáveis iguais, com exceção do inóculo e da variável extrato de levedura.

Visando aumentar a produção da enzima fora do ponto central o inóculo, o qual se mostrou uma variável positiva no segundo PB, foi fixado em  $1 \times 10^7$  células e o extrato de levedura foi eliminado. Estas duas variáveis foram substituídas por duas novas, sacarose (fonte de carbono) e NaNO<sub>3</sub> (fonte nitrogênio).

Assim, o terceiro planejamento contou com nove variáveis e quatro pontos centrais, totalizando 20 ensaios (**Tabela 8**) e utilizando a matriz de PB 16 para sua elaboração (**Anexo 3**).

**Tabela 7.** Resultados estatísticos do segundo planejamento experimental do tipo PB para a produção de xilanases, pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| Dados Estatísticos                                |           |          |           |          |
|---------------------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|
|                                                   | Effect    | Std.Err. | t(9)      | p        |
| Mean/Interc.                                      | 0,743609  | 0,260011 | 2,859916  | 0,021154 |
| 1 Xilana                                          | 0,002277  | 0,600469 | 0,003793  | 0,997067 |
| 2 Farelo de Trigo                                 | -0,437873 | 0,600469 | -0,729219 | 0,486666 |
| 3 Peptona                                         | 0,203927  | 0,600469 | 0,339613  | 0,742892 |
| 4 Extrato de Soja                                 | 0,104137  | 0,600469 | 0,173427  | 0,866624 |
| 5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,433319  | 0,600469 | 0,721634  | 0,491070 |
| 6 CaCl <sub>2</sub>                               | -0,264794 | 0,600469 | -0,440979 | 0,670902 |
| 7 pH                                              | 0,405576  | 0,600469 | 0,675433  | 0,518443 |

**Tabela 8.** Variáveis aplicadas ao terceiro PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| Variáveis                                          | -1  | 0                  | +1                 |
|----------------------------------------------------|-----|--------------------|--------------------|
| 1. Sacarose                                        | 0   | 1% (0,5 g/50mL)    | 2% (1,0 g/50mL)    |
| 2. Xilana                                          | 0   | 1% (0,5 g/50mL)    | 2% (1,0 g/50mL)    |
| 3. Farelo de Trigo                                 | 0   | 1% (0,5 g/50mL)    | 2% (1,0 g/50mL)    |
| 4. Peptona                                         | 0   | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 5. NaNO <sub>3</sub>                               | 0   | 0,1% (0,05 g/50mL) | 0,2% (0,10 g/50mL) |
| 6. Extrato de Soja                                 | 0   | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 7. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0   | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 8. CaCl <sub>2</sub>                               | 0   | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 9. pH                                              | 4,5 | 5,5                | 6,5                |

Com este terceiro planejamento foi alcançado o objetivo de deslocar a maior produção para um ensaio que não fosse no ponto central. O ensaio 7 apresentou maior produção da enzima (2,28 uMol/mL/Min). Deste modo, foi possível obter duas variáveis significativas, uma negativa (CaCl<sub>2</sub>) e uma positiva (extrato de soja) (**Tabela 9**).

No entanto, a produção de xilanases deste PB permaneceu igual ao do segundo PB, o que é aproximadamente três vezes menor do que a obtida no primeiro. Provavelmente, a presença da sacarose fez com que a levedura a utilizasse como fonte de carbono, reduzindo a produção de xilanases, o que tornou esta variável prejudicial.

**Tabela 9.** Resultados estatísticos do terceiro planejamento experimental do tipo PB para a produção de xilanases, pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101. As variáveis positivas estão contornadas.

| Dados Estatísticos |                                                 |         |          |         |        |
|--------------------|-------------------------------------------------|---------|----------|---------|--------|
|                    | Mean/Interc.                                    | Effect  | Std.Err. | t(9)    | p      |
|                    |                                                 | 0,5035  | 0,0935   | 5,3881  | 0,0004 |
| 1                  | Sacarose                                        | -0,1710 | 0,2037   | -0,8393 | 0,4230 |
| 2                  | Xilana                                          | 0,1601  | 0,2037   | 0,7860  | 0,4521 |
| 3                  | Farelo de Trigo                                 | -0,1585 | 0,2037   | -0,7783 | 0,4563 |
| 4                  | Peptona                                         | 0,3315  | 0,2037   | 1,6276  | 0,1381 |
| 5                  | NaNO <sub>3</sub>                               | 0,1849  | 0,2037   | 0,9079  | 0,3876 |
| 6                  | Extrato de Soja                                 | 0,6688  | 0,2037   | 3,2834  | 0,0095 |
| 7                  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,0849  | 0,2037   | 0,4170  | 0,6865 |
| 8                  | CaCl <sub>2</sub>                               | -0,4921 | 0,2037   | -2,4158 | 0,0389 |
| 9                  | pH                                              | -0,0666 | 0,2037   | -0,3270 | 0,7511 |

As variáveis significativas permitiram a elaboração de um quarto PB com menos variáveis, possibilitando a análise de um menor número de fatores influenciando a produção. Três variáveis foram eliminadas (sacarose, farelo de trigo e CaCl<sub>2</sub>), uma foi fixada (pH 4.5), as demais foram aumentadas e o inóculo foi mantido fixo em  $1 \times 10^7$  células.

Assim, o quarto PB realizado possuía 5 variáveis com 4 pontos centrais, totalizando 16 ensaios (**Tabela 10**), utilizando para sua elaboração a matriz codificada PB 12 (**Anexo 4**).

**Tabela 10.** Variáveis aplicadas ao quarto PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| VARIÁVEL                                          | -1 | 0                  | 1                  |
|---------------------------------------------------|----|--------------------|--------------------|
| 1 xilana                                          | 0  | 2% (1,0 g/50mL)    | 4% (2,0 g/50mL)    |
| 2 peptona                                         | 0  | 0,4% (0,20 g/50mL) | 0,8% (0,40 g/50mL) |
| 3 NaNO <sub>3</sub>                               | 0  | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 4 Extrato de soja                                 | 0  | 0,4% (0,20 g/50mL) | 0,8% (0,40 g/50mL) |
| 5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0  | 0,4% (0,20 g/50mL) | 0,8% (0,40 g/50mL) |

Os resultados demonstraram que a maior produção de xilanases ocorreu fora do ponto central (Ensaio 2), mas sua quantidade foi reduzida (1,48 uMol/mL/Min) (**Tabela 11**). A xilana foi a única variável significativa, o que era esperado, pois trata-se da única fonte de carbono presente no quarto PB, embora resíduos de carbono possam ser encontrados nas fontes de nitrogênio,

extrato de soja e peptona. Porém, este fato não justifica a baixa produção enzimática obtida.

**Tabela 11.** Resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 no quarto PB com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.

| Atividade Enzimática |          |        |          |
|----------------------|----------|--------|----------|
| Ensaio               | U/mL/Min | Ensaio | U/mL/Min |
| 1                    | 0,00     | 9      | 0,00     |
| 2                    | 1,48     | 10     | 0,45     |
| 3                    | 0,03     | 11     | 0,02     |
| 4                    | 0,43     | 12     | 0,00     |
| 5                    | 0,74     | 13 (c) | 1,09     |
| 6                    | 0,24     | 14 (c) | 1,00     |
| 7                    | 0,00     | 15 (c) | 0,70     |
| 8                    | 0,05     | 16 (c) | 0,48     |

(c) = ensaio controle.

Diante do resultado do quarto PB o próximo foi elaborado similar ao terceiro, mas trocando as duas variáveis adicionadas ( $\text{NaNO}_3$  e sacarose) que não surtiram aumento na produção por outras duas. As variáveis escolhidas foram o bagaço de cana e a palha de arroz (ambas fontes de carbono), consideradas como fontes de carbono importantes para a produção de biocombustível.

Assim como o terceiro PB, o quinto foi elaborado com nove variáveis diferentes e quatro pontos centrais, totalizando 20 ensaios (**Tabela 12**) e utilizando a matriz codificada PB 16 (**Anexo 3**).

**Tabela 12.** Variáveis aplicadas ao quinto PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| Variáveis                       | -1                   | 0                    | 1                    |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1. xilana                       | 0                    | 1% (0,5 g/50mL)      | 2% (1,0 g/50mL)      |
| 2. peptona                      | 0                    | 0,1% (0,05 g/50mL)   | 0,2% (0,10 g/50mL)   |
| 3. extrato de soja              | 0                    | 0,1% (0,05 g/50mL)   | 0,2% (0,10 g/50mL)   |
| 4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0                    | 0,2% (0,10 g/50mL)   | 0,4% (0,20 g/50mL)   |
| 5. Bagaço de cana               | 0                    | 3% (1,5 g/50mL)      | 6% (3,0 g/50mL)      |
| 6. Palha de arroz               | 0                    | 3% (1,5 g/50mL)      | 6% (3,0 g/50mL)      |
| 7. Farelo de Trigo              | 0                    | 1% (0,5 g/50mL)      | 2% (1,0 g/50mL)      |
| 8. pH                           | 4                    | 5                    | 6                    |
| 9. Inóculo                      | $1 \times 10^5$ cels | $1 \times 10^6$ cels | $1 \times 10^7$ cels |

A análise dos dados do quinto PB revelou que as novas variáveis não foram eficazes na estimulação da produção de xilanases pela levedura *Candida* sp. L101, embora tenha se mostrado eficaz para fungos filamentosos. O melhor resultado apresentando neste PB foi 1,82  $\mu\text{Mol/mL/Min}$  de xilanases no Ensaio 15 (**Tabela 13**), com apenas o inóculo como variável significativa.

Este resultado indica que, possivelmente, o teor de lignina da palha de arroz (~4,5%) associado ao excesso de N mineral ou orgânico possa ter sido inadequado para a levedura *Candida* sp. L101, inibindo sua síntese de xilanases. Fato que também deve ter ocorrido com a variável bagaço de cana, pois segundo Soren (2012), embora apresente hemicelulose (20-25%), o bagaço de cana possui em sua composição maior quantidade de celulose (45-55%), possivelmente inibindo a produção de xilanases e induzindo a produção de celulasas.

**Tabela 13.** Resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 no quinto PB com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.

| Ensaio | U/mL/Min | Ensaio | U/mL/Min |
|--------|----------|--------|----------|
| 1      | 0,01     | 11     | 0,00     |
| 2      | 0,18     | 12     | 0,27     |
| 3      | 0,54     | 13     | 0,50     |
| 4      | 1,45     | 14     | 0,01     |
| 5      | 0,36     | 15     | 1,82     |
| 6      | 0,41     | 19     | 0,00     |
| 7      | 0,55     | 17 (C) | 0,85     |
| 8      | 0,02     | 18 (C) | 1,10     |
| 9      | 0,00     | 19 (C) | 1,06     |
| 10     | 0,18     | 20 (C) | 1,01     |

(c) = ensaio controle.

Considerando os resultados obtidos no quinto PB, foi proposto um sexto PB utilizando como base as variáveis do primeiro PB. A estratégia de alterar as variáveis utilizadas não surtiu o efeito desejado de aumentar a produção de xilanases, então mudou-se a estratégia e foram alteradas apenas as concentrações de algumas variáveis do primeiro PB para que, assim, a melhor produção se deslocasse do ponto central como foi obtido anteriormente.

Assim, o sexto PB foi elaborado com nove variáveis diferentes e quatro pontos centrais, totalizando 20 ensaios (**Tabela 14**) e utilizando a matriz codificada PB 16 (**Anexo 3**).

**Tabela 14.** Variáveis aplicadas ao sexto PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp L101.

| Variáveis                                          | -1                     | 0                      | 1                      |
|----------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1. xilana                                          | 0                      | 0,5% (0,25 g/50mL)     | 1% (0,5 g/50mL)        |
| 2. peptona                                         | 0                      | 0,1% (0,05 g/50mL)     | 0,2% (0,10 g/50mL)     |
| 3. extrato de levedura                             | 0                      | 0,04% (0,04 g/50mL)    | 0,08% (0,04 g/50mL)    |
| 4. extrato de soja                                 | 0                      | 0,1% (0,05 g/50mL)     | 0,2% (0,10 g/50mL)     |
| 5. Farelo de Trigo                                 | 0                      | 0,5% (0,25 g/50mL)     | 1% (0,5 g/50mL)        |
| 6. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0                      | 0,1% (0,05 g/50mL)     | 0,2% (0,10 g/50mL)     |
| 7. CaCl <sub>2</sub>                               | 0                      | 0,1% (0,05 g/50mL)     | 0,2% (0,10 g/50mL)     |
| 8. pH                                              | 4                      | 5                      | 6                      |
| 9. Inóculo                                         | 1x10 <sup>5</sup> cels | 1x10 <sup>6</sup> cels | 1x10 <sup>7</sup> cels |

No sexto PB realizado houve uma produção de xilanases semelhante ao do primeiro PB, o que era esperado. Porém, diferente do primeiro PB, nesse planejamento o objetivo de alcançar uma alta produção fora do ponto central foi obtido.

Houve três ensaios com maiores produções e valores próximos. O Ensaio 1 (6,31 µMol/mL/Min), o Ensaio 8 (6,34 µMol/mL/Min) e o Ensaio 17(C) (6,64 µMol/mL/Min). Estes valores dentro da margem de erro de um desvio padrão de 5% se tornam significativamente iguais.

O Ensaio 17(C) é um ensaio do ponto central, então foi descartado como melhor resultado, assim, a escolha foi entre as condições do Ensaio 1 e as do Ensaio 8. Como o Ensaio 1 apresentou em sua composição, segundo a matriz codificada PB 16 (**Anexo 3**) e a **Tabela 14**, mais variáveis no nível -1 que, no caso, representam ausência da mesma (com exceção do pH e do inóculo), este ensaio foi considerado o melhor resultado, pois a partir dele é possível gerar um PB com menos variáveis e também diminuir o custo da produção (meio de cultura).

Com o melhor ensaio definido foi possível dar continuidade ao planejamento experimental. O pH foi a única variável significativa e sendo a mesma de efeito positivo (**Tabela 15**) o seu maior valor (pH 6) foi significativamente bom para a produção. Deste modo, para o sétimo

planejamento, a variável pH foi aumentada. Além disso, com base nos efeitos, duas variáveis negativas (extrato de levedura e extrato de soja) foram eliminadas, o inóculo foi fixado ( $1 \times 10^7$  células) e as variáveis xilana, peptona, farelo de trigo e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram aumentadas.

**Tabela 15.** Resultados estatísticos do sexto planejamento experimental do tipo PB para a produção de xilanases, pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101. As variáveis positivas estão contornadas.

| Dados Estatísticos |                              |         |          |         |        |
|--------------------|------------------------------|---------|----------|---------|--------|
|                    | Mean/Interc.                 | Effect  | Std.Err. | t(9)    | p      |
|                    |                              | 2,9038  | 0,5015   | 5,7897  | 0,0002 |
| 1                  | xilana                       | 1,7451  | 1,1215   | 1,5561  | 0,1507 |
| 2                  | peptona                      | 1,0675  | 1,1215   | 0,9519  | 0,3636 |
| 3                  | extrato de levedura          | -0,1818 | 1,1215   | -0,1621 | 0,8744 |
| 4                  | extrato de soja              | -1,0815 | 1,1215   | -0,9643 | 0,3576 |
| 5                  | Farelo de Trigo              | 1,8153  | 1,1215   | 1,6187  | 0,1366 |
| 6                  | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,2287  | 1,1215   | 0,2039  | 0,8425 |
| 7                  | CaCl <sub>2</sub>            | 0,1610  | 1,1215   | 0,1436  | 0,8887 |
| 8                  | pH                           | 2,3594  | 1,1215   | 2,1038  | 0,0617 |
| 9                  | Inóculo                      | 1,2243  | 1,1215   | 1,0917  | 0,3006 |

A variável  $\text{CaCl}_2$  foi eliminada com base nos dados dos outros PB, nos quais esta sempre se apresentou como negativa para a produção de xilanases pela *Candida* sp. L101, além de apresentar no sexto PB o valor de p (significância) mais distante de zero, deste modo, a variável menos significativa.

Diante das modificações realizadas, o sétimo PB foi elaborado com 5 variáveis e 4 pontos centrais, totalizando 16 ensaios (**Tabela 16**) utilizando a matriz codificada PB 12 (**Anexo 4**).

**Tabela 16.** Variáveis aplicadas ao sétimo PB para a produção de xilanases pela levedura da Antártica *Candida* sp. L101.

| VARIÁVEL                       | -1 | 0                  | 1                  |
|--------------------------------|----|--------------------|--------------------|
| 1 xilana                       | 0  | 1% (0,5 g/50mL)    | 2% (1,0 g/50mL)    |
| 2 peptona                      | 0  | 0,4% (0,20 g/50mL) | 0,8% (0,40 g/50mL) |
| 3 Farelo de Trigo              | 0  | 1% (0,5 g/50mL)    | 2% (1,0 g/50mL)    |
| 4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0  | 0,2% (0,10 g/50mL) | 0,4% (0,20 g/50mL) |
| 5 pH                           | 6  | 7                  | 8                  |



No sétimo PB realizado, os resultados de produção enzimática obtidos foram semelhantes aos obtidos no PB anterior. A maior produção de xilanases foi de 5,99  $\mu\text{Mol/mL/Min}$  (Ensaio 7, **Tabela 17**), e não houve variáveis significativas, embora o pH tenha sido a variável mais próxima do valor de  $p \leq 0,1$ , possuindo um efeito negativo.

**Tabela 17.** Resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 no sétimo PB com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.

| Atividade Enzimática |          |        |          |
|----------------------|----------|--------|----------|
| Ensaio               | U/mL/Min | Ensaio | U/mL/Min |
| 1                    | 0,85     | 9      | 0,00     |
| 2                    | 2,56     | 10     | 0,22     |
| 3                    | 0,00     | 11     | 0,00     |
| 4                    | 0,82     | 12     | 0,00     |
| 5                    | 0,00     | 13 (c) | 3,69     |
| 6                    | 0,37     | 14 (c) | 3,21     |
| 7                    | 5,99     | 15 (c) | 3,74     |
| 8                    | 0,00     | 16 (c) | 3,77     |

(c) = ensaio controle.

Tendo em vista o aumento da produção de xilanases em torno de 10-11 vezes à produção sem aplicação dos planejamentos experimentais (que se manteve constante dos dois últimos experimentos) e considerando a redução na quantidade de variáveis que compõem o meio de cultivo, o melhor resultado (sétimo PB) foi submetido ao experimento de validação.

Dentre os ensaios do sétimo PB, o meio de cultivo do Ensaio 7 foi o escolhido por apresentar o melhor valor de produção enzimática: 0,8% (0,40 g/50 mL) de peptona, 2% (1,0 g/50 mL) de farelo de trigo, 0,4% (0,20 g/50 mL) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 6 e o inóculo de  $1 \times 10^7$  células.

O experimento de validação foi elaborado contendo 3 ensaios para cada dia de cultivo, durante um período de oito dias, com a condição de cultivo selecionada como a melhor. Em adição, também foi elaborado dois ensaios para cada dia, durante oito dias, contendo as condições de cultivo do segundo melhor resultado do sétimo PB, o meio de cultivo dos ensaios do ponto central: 1% (0,5 g/50 mL) de xilana, 0,4% (0,20 g/50mL) de peptona, 1% (0,5 g/50mL) de farelo de trigo, 0,2% (0,10 g/50mL) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7 e o inóculo de  $1 \times 10^7$  células. Estes ensaios foram elaborados com o intuito de serem parâmetro de

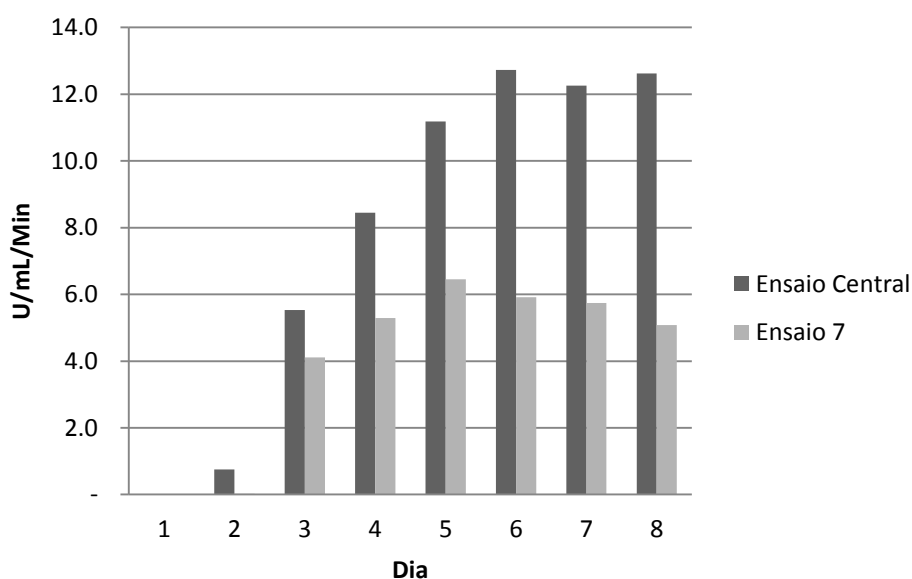
comparação dos resultados obtidos na validação do meio de cultivo do Ensaio 7.

Os resultados da validação revelaram uma produção mais alta da enzima com o meio de cultivo do ponto central (**Tabela 18**). Foi a maior produção obtida durante o trabalho, alcançando a produção média de xilanases de 12,73  $\mu\text{Mol/mL/Min}$  no sexto dia (**Figura 3**), com um desvio padrão de 0,79  $\mu\text{Mol/mL/Min}$ (6,2%).

**Tabela 18.** Média dos resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 na Validação com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.

| Dia | Ensaio Central<br>(U/mL/Min) | Ensaio 7<br>(U/mL/Min) |
|-----|------------------------------|------------------------|
| 1   | -                            | -                      |
| 2   | 0,75                         | 0,03                   |
| 3   | 5,53                         | 4,11                   |
| 4   | 8,44                         | 5,29                   |
| 5   | 11,18                        | 6,45                   |
| 6   | 12,73                        | 5,92                   |
| 7   | 12,26                        | 5,74                   |
| 8   | 12,62                        | 5,08                   |

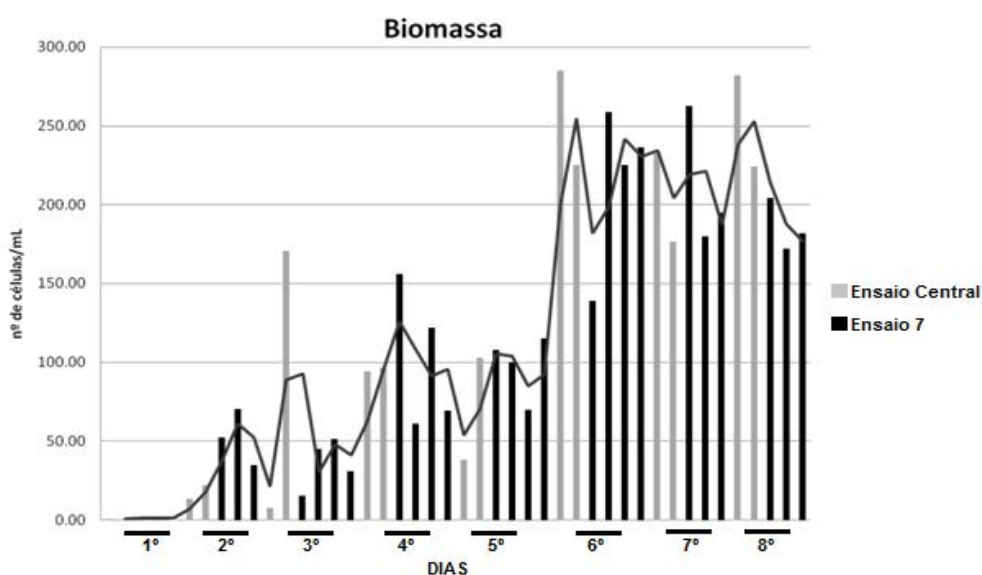
**Figura 3.** Médias da atividade de xilanases de *Candida* sp. L101 na validação com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.



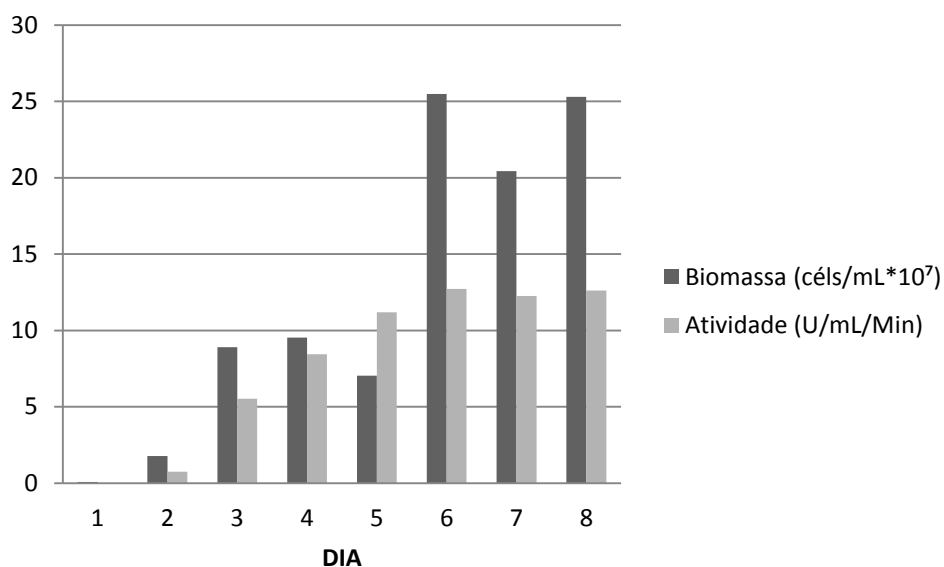
Além da quantificação das xilanases, foi realizada a estimativa de biomassa para cada dia do experimento. O resultado geral obtido encontra-se na **Figura 4**. Uma correlação entre a biomassa e a atividade enzimática é representada na **Figura 5** e na **Figura 6** para o Ensaio Central e Ensaio 7, respectivamente.

Os resultados revelaram que os maiores valores de biomassa no ponto central (gráfico 3) estão associadas a maior produção da enzima. Este fato não foi observado nos resultados do Ensaio 7 (Gráfico 4), no qual a maior produção se dá no dia anterior ao de maior quantidade de biomassa, fato que pode indicar a produção de tipos diferentes da enzima xilanase sendo produzidas para cada meio de cultura.

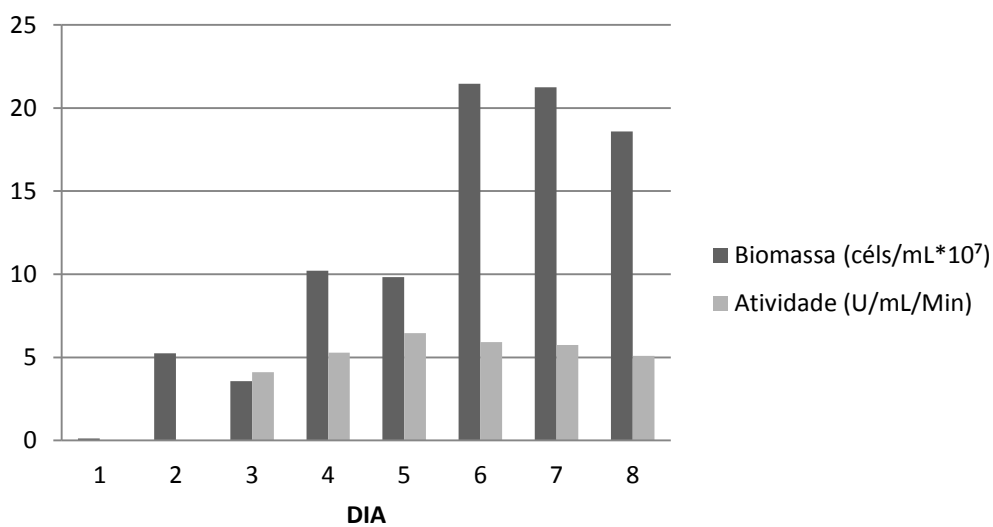
**Figura 4.** Biomassa em células por mL de *Candida* sp. L101 na Validação com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm



**Figura 5.** Biomassa (células por mL x  $10^7$ ) e atividade xilanolítica de *Candida* sp. L101 no Ensaio Central da Validação com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.



**Figura 6.** Biomassa (células por mL x  $10^7$ ) e atividade xilanolítica de *Candida* sp. L101 no Ensaio 7 da Validação com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm



Considerando os resultados de biomassa e produção enzimática obtidos na validação, o meio de cultivo do Ensaio Central do sétimo PB foi considerado como o melhor para a produção de xilanases por *Candida* sp. L101.

O meio de cultivo do Ensaio Central apresenta um componente a mais em sua composição (xilana), mas este apresenta metade da concentração dos demais componentes (peptona, farelo de trigo e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), o que não o torna mais custoso do que o meio de cultivo encontrado no Ensaio 7. Assim, alíquotas do caldo enzimático retiradas do sexto dia de cultivo deste experimento foram utilizadas para a caracterização preliminar das xilanases produzidas.

Na caracterização preliminar a metodologia de reação enzimática (enzima-substrato) foi testada novamente. Esta foi testada no início do trabalho, constatando que entre a metodologia de 25°C por 120 min e 40°C por 15 min, a segunda se mostrou mais eficaz.

Deste modo, foi testado se essa metodologia ainda poderia ser melhorada e, para isso, foram analisadas duas diferentes temperaturas para a reação enzimática da xilanase por diferentes tempos, 40°C (por 5,10,15,20 e 25 min) e 45°C (por 5,10,15 e 20 min).

Os resultados revelaram que o melhor resultado foi para a reação enzimática foi a 40°C por 5 min, um pouco maior do que a 45°C (**Tabela 19**), sendo assim, possível melhorar a metodologia em relação ao tempo de reação.

**Tabela 19.** Média dos resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 nos testes à 40°C e 45°C com a amostra do sexto dia do Ensaio Central da validação.

| Tempo (Min) | U/mL/Min | % do Desvio Padrão |
|-------------|----------|--------------------|
| 40 °C       |          |                    |
| 5           | 15,8     | 5,8%               |
| 10          | 14,9     | 3,8%               |
| 15          | 13,3     | 4,3%               |
| 20          | 11,1     | 4,0%               |
| 25          | 10,9     | 4,2%               |
| 45 °C       |          |                    |
| 5           | 14,7     | 4,9%               |
| 10          | 10,7     | 9,5%               |
| 15          | 7,6      | 8,6%               |
| 20          | 8,9      | 9,6%               |

Também foram testados diferentes pH para a determinação da faixa de atuação de atividade enzimática da xilanase obtida. Foram testados três tampões diferentes, tampão acetato de sódio (pH 4.0, 4.6, 5.0 e 5,6), tampão de **Mcllavaine** (pH 3.0, 3.6, 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6.0, 6.6, 7.0) e tampão Tris-HCl (pH 8.0 e 9.0). Os resultados demonstraram uma faixa de atuação desde o pH 3.0 até o pH 7.0. Não foi possível detectar atividade enzimática no tampão Tris-HCl. O melhor resultado de reação enzimática alcançado (**22,6 U/mL/Min**) foi em pH 4.6 e tampão acetato de sódio (**Tabela 20**).

**Tabela 20.** Média dos resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 nos testes de pH com a amostra do sexto dia do Ensaio Central da validação.

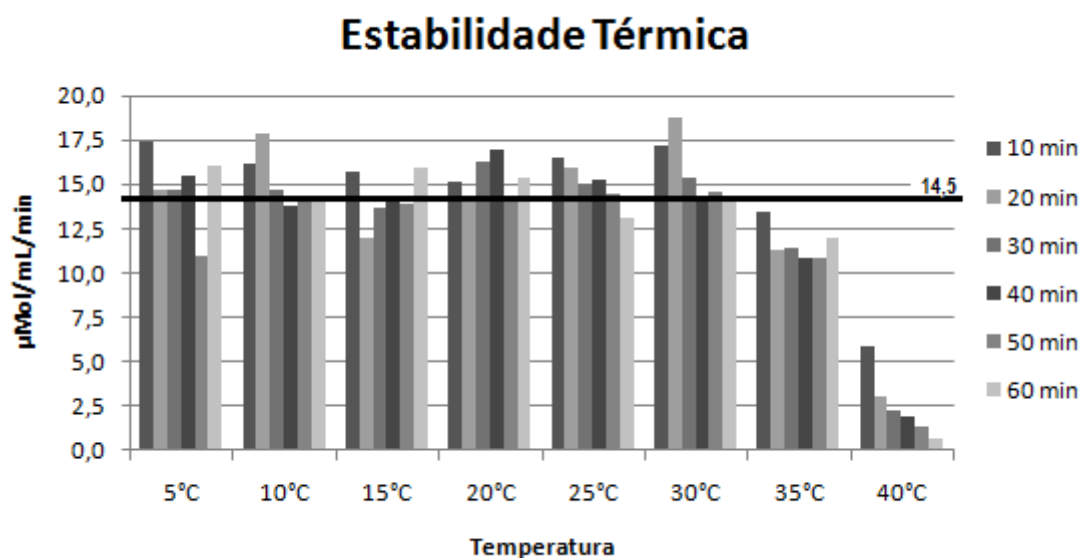
| Tampão | Mcllavaine | Acetato de Sódio |
|--------|------------|------------------|
| pH     | U/mL/Min   | U/mL/Min         |
| 3      | 6,8        | -                |
| 3,6    | 8,1        | -                |
| 4      | 3,1        | 6,3              |
| 4,6    | 14,3       | 22,6             |
| 5      | 13,6       | 20,8             |
| 5,6    | 13,4       | 16,0             |
| 6      | 13,5       | -                |
| 6,6    | 17,7       | -                |
| 7      | 9,3        | -                |
| 8      | -          | -                |
| 9      | -          | -                |

Após definir a melhor temperatura e o melhor pH de reação enzimática foi possível realizar um teste de estabilidade térmica das xilanases produzidas por *Candida* sp. L101.

Foram testadas temperaturas, na faixa de 5°C à 45°C com um intervalo de 5°C entre cada, realizando leituras de 10 em 10 minutos por uma hora. Os resultados estão apresentados na **Figura 7**, onde foi possível verificar estabilidade da enzima em torno de 90-100% nas temperaturas entre 5°C e 30°C após uma hora de incubação do caldo bruto. Após a temperatura de 35°C começa a haver perda na estabilidade, com uma perda significativa em 40°C e com 45°C não foi detectada atividade enzimática já nos primeiros 10 min, sugerindo a desnaturação completa da enzima.

A alta estabilidade da enzima em temperaturas entre 5 e 30°C após uma hora de incubação e a desnaturação da mesma a partir de 40°C, corrobora estudos da literatura que demonstram a propriedade das enzimas adaptadas ao frio em serem produzidas em temperaturas mais baixas do que a temperatura de desnaturação. Este fato, dificilmente ocorre em enzimas mesofílicas e termofílicas, onde a temperatura ótima de produção é muito próxima ou igual à temperatura de desnaturação da enzima (MARGESIN *et al.*, 2002).

**Figura 7.** Média dos resultados obtidos da produção de xilanase por *Candida* sp. L101 no teste de estabilidade térmica amostra do sexto dia do Ensaio Central da validação. Linha horizontal preta indica a média do tempo zero.



Os resultados do teste de estabilidade térmica revelaram que as xilanases produzidas pela *Candida* sp. L101 não apresentaram uma boa estabilidade térmica nas temperaturas mais altas, o que era esperado por se tratar de uma levedura psicrotolerante isolada da Antártica. Segundo Gomes (2007), durante o curso da evolução, as enzimas foram ajustando suas interações estabilizadoras, de modo a aperfeiçoarem o balanço entre rigidez (para a estabilidade) e flexibilidade (para atividade). Para que uma proteína de psicrófilo tenha eficiência catalítica a 10°C comparável à dos mesófilos a 37°C ela deve exibir, naquela temperatura, um movimento térmico similar ao da mesofílica. Deste modo, quando a enzima de um micro-organismo psicrófilo é

exposta a 37°C, o movimento térmico torna-se tão acelerado que pode levar à perda de sua estrutura nativa.

Esse resultado de estabilidade térmica pode indicar que as xilanases produzidas pela *Candida* sp. L101 apresentam uma alta flexibilidade, o que sugere uma capacidade da enzima mudar sua conformação de maneira a apresentar uma maior afinidade entre enzima e substrato.

Cabe ressaltar que este resultado corrobora com o resultado da metodologia de reação enzimática, a qual ocorre a 40°C, mas tem uma duração muito curta (5 min), tempo inferior ao primeiro observado no teste de estabilidade. Sendo assim, os resultados sugerem que a alta temperatura possibilite a aceleração da reação (afinidade da enzima com o substrato), mas sem que dure o suficiente para que a enzima perca sua estabilidade.

O complexo lignocelulósico é composto por uma matriz de celulose e lignina preso por correntes de hemicelulose. A lignina dificulta o acesso aos açúcares presentes no complexo, tornando o pré-tratamento necessário para acesso da superfície e possível utilização pelo micro-organismo na produção do bioetanol (SINGH e BISHNOI, 2012). Após o pré-tratamento com hidrólise enzimática do material lignocelulósico geralmente há uma mistura de açúcares e a possibilidade da utilização destes é essencial para a produção econômica do etanol (Saha *et al.*, 2011).

As características apresentadas pelas xilanases, produzidas pela levedura *Candida* sp. L101, lhes tornam promissoras para utilização em um pré-tratamento do material lignocelulósico visando a produção do bioetanol.

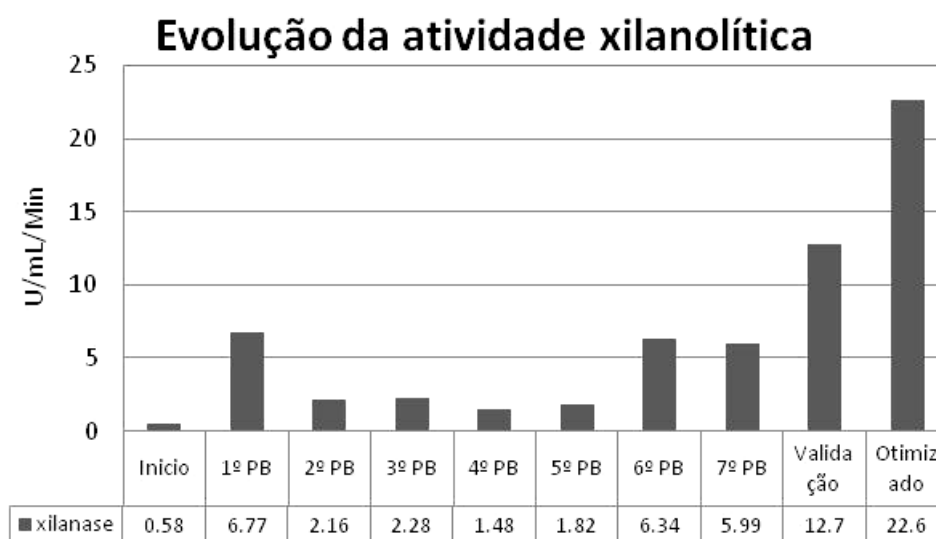
Devido sua estabilidade em baixas e médias temperaturas, indicando uma alta afinidade entre enzima e substrato, é possível realizar um pré-tratamento no qual se utilize essas xilanases em uma temperatura alta para a enzima, mas sem que ocorra a desnaturação. Essa temperatura (por volta de 40°C) possibilitará que ocorra uma reação rápida e eficaz por estas xilanases, tornando o processo mais produtivo, diferente de temperaturas mais elevadas e reações mais demoradas que devem ser utilizadas para xilanases de organismos não psicotolerantes.



Além da possível utilização das xilanases em um pré-tratamento, é possível buscar um consórcio da *Candida* sp. L101 com outro(s) micro-organismo(s) para um pré-tratamento mais eficaz ou, como o estudado no trabalho de Saha *et al.* (2011), verificar a possibilidade de uma sacarificação e fermentação simultânea para produção do etanol de segunda geração.

Na **Figura 8** está apresentada a evolução da produção de xilanases por *Candida* sp. L101 durante o desenvolvimento do presente trabalho, desde a primeira produção obtida, todos os planejamentos experimentais (PB), até a condição otimizada (melhor meio e tempo de produção com o melhor tampão, pH e temperatura de reação enzimática).

**Figura 8.** Evolução das melhores atividades xilanolíticas obtidas por *Candida* sp. L101 com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.



Os resultados deste trabalho, onde foi alcançado um aumento significativo da produção de xilanases por *Candida* sp. L101, foram obtidos utilizando o modelo de planejamento experimental Plackett&Burman. Este modelo é utilizado para triagem de variáveis, assim, o resultado estatístico obtido ao se analisar o PB é uma soma dos dados de todas as interações obtidas no planejamento. Portanto, o efeito negativo ou positivo resultante não é necessariamente um efeito real.

Por exemplo, se a reação da variável A com a variável B foi positiva em 3 unidades, mas a reação da variável A com a variável C foi negativa em 4

unidades o resultado final para a variável A é de efeito negativo em 1 unidade. Deste modo, não é possível a análise individual das interações entre variáveis em cada ensaio.

Desta forma, seria interessante dar continuidade a este projeto com a aplicação de outro modelo de planejamento experimental, no qual seria possível avaliar melhor cada variável utilizada e suas interações, como o modelo de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o andamento do trabalho os objetivos foram modificados. Estava previsto no projeto inicial o escalonamento da produção de xilanases *Candida* sp. L101 na condição otimizada. No entanto, como só foi utilizado o planejamento experimental do tipo Plackett&Burman, este objetivo foi substituído pela caracterização preliminar das xilanases produzidas pela *Candida* sp. L101.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível obter resultados interessantes e uma produção satisfatória de xilanases após a condução do planejamento experimental utilizando o modelo Plackett&Burman (PB). O objetivo principal do trabalho foi alcançado, com o aumento da produção de xilanases pela *Candida* sp. L101.

O resultado obtido demonstrou um aumento de aproximadamente 38 vezes (**22,6 uMol/mL/Min**) em relação a produção obtida inicialmente, o que demonstra eficácia na técnica de planejamento experimental, apesar das dificuldades encontradas na condução da mesma.

As xilanases obtidas apresentaram um bom desempenho em diferentes faixas de pH (reação enzimática) com atividade em pH 3.0 até pH 7.0, o que agrega valor a essa enzima. As alterações na metodologia de quantificação de xilanases propostas (mudança no tempo, pH e temperatura de reação enzimática) resultaram em um método mais eficiente e adequado para a

quantificação da enzima, o qual servirá de base para todos os outros alunos do nosso grupo de pesquisa que trabalham ou virão a trabalhar com xilanases.

Cabe ressaltar que as xilanases obtidas são enzimas exógenas produzidas por uma levedura. As leveduras possuem células maiores e mais resistentes que bactérias e possuem ciclo de vida mais rápido que fungos filamentosos, facilitando os processos de fermentação em larga escala. Além disso, a produção enzimática da *Candida* sp. L101 ocorre a 20°C, temperatura próxima da ambiente, diminuindo gastos com a manutenção de temperatura (energia elétrica).

A levedura *Candida* sp L101 não alcançou níveis elevados (>500  $\mu\text{Mol/mL/min}$ ) de produção enzimática se comparada com fungos filamentosos, como no trabalho de Santos (2015), no qual *Aspergillus tubingensis* apresentou uma produção de xilanases de 561,59 U/mL ou o trabalho de Gupta *et al.* (2013) no qual *Melanocarpus albomyces* obteve uma produção de 520 U/mL, mas ainda há possibilidade melhorar sua produção e esta apresenta características interessantes, propriedades importantes que são relacionadas às enzimas adaptadas ao frio.

Desta forma, estes resultados indicam que a *Candida* sp L101 é um promissor recurso genético para a produção de xilanases e futura aplicação na produção de bioetanol, bem como estimulam novos estudos, incluindo a avaliação da cinética enzimática, purificação da enzima e clonagem e expressão heteróloga.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BNDES E CGEE. Bioenergia e biocombustíveis. In: Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro. 2008. Cap. 1. p. 25-36.
2. BOLOTIN-FUKUHARA, M. Genomics and biodiversity in yeasts. In: Biodivers Ecophysiol Yeasts, Ser Yeast Handb. Rosa C, Peter G, editors. Springer Berlin, Heidelberg; 2006: p.45-66. [The Yeast Handbook]
3. BOONLUE, Sophon; AIMI, Tadanori; MORINAGA, Tsutomu. Molecular characterization of a xylanase-producing thermophilic fungus isolated from Japanese soil. *Current microbiology*, v. 47, n. 2, p. 0119-0124, 2003.
4. BRADNER, J. R. et al. Hemicellulase activity of antarctic microfungi. *Journal of applied microbiology*, v. 87, n. 3, p. 366-370, 1999.
5. BRUSTULIN, R., CARREIRO S. C., Degradação de Xilana e Assimilação de Pentoses por Leveduras. 9º Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Tocantins, 2013
6. BURUIANA, CRISTIAN-TEODOR et al. Bioethanol production from residual lignocellulosic materials: a review–Part 1. *Annals of the University" Dunarea de Jos" of Galati-Fascicle VI: Food Technology*, v. 37, n. 1, p. 9-24, 2013.
7. CUNICO, M. W. M. et al. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA ESTATÍSTICA VALIOSA PARA A DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA PESQUISA CIENTÍFICA. *Visão Acadêmica*, v. 9, n. 1, 2008.
8. D'AMICO, S.; COLLINS, T.; MARX, J.; FELLER, G.; GERDAY, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *European Molecular Biology Organization*, 7, 385-389.
9. DELABONA, P. da S. et al. Isolamento de fungos visando à produção de enzimas celulolíticas para aplicação na hidrólise da biomassa. In: Embrapa Instrumentação-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA CIENTÍFICA-EMBRAPA SÃO CARLOS, 2009, São Carlos, SP. Anais... São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. p. 9 (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 90), 2010.
10. DUARTE, A. W. F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles*, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013.
11. GEORLETTE, D. et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS microbiology reviews*, v. 28, n. 1, p. 25-42, 2004.
12. GERDAY, Charles et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 103-107, 2000.
13. GOLDEMBERG, J. Prefácio. In: BNDES E CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro. 2008. p. 13-14.

14. GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química nova*, v. 30, n. 1, p. 136, 2007.
15. GOMES, Joseph; STEINER, Walter. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, v. 42, n. 4, p. 223-235, 2004.
16. GONÇALVES, D. L. Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose. 2010.
17. GUPTA, Gupteshwar et al. Optimization of xylanase production from *Melanocarpus albomyces* using wheat straw extract and its scale up in stirred tank bioreactor. *Indian J Chem Technol*, v. 20, p. 282-289, 2013.
18. KURTZMAN, Cletus; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, 2011. Cap. 01. p. 03.
19. FERREIRA, J., Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. *Rev. Conexão Eletrônica*. Três Lagoas, MS. V.12, nº1. 2015
20. FERREIRA, L. L. Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de xilanases associadas à madeira e bagaço de cana em decomposição. (Monografia de Especialista, Universidade Federal de Minas Gerais). Belo Horizonte, 2010.
21. MADIGAN, M. T. et al. *Biologia Celular Eucariótica e Micro-organismos Eucarióticos*. In: *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2010. Cap. 18. p. 535-542.
22. MARGESIN, R et al. Cold adapted Microorganisms: Adaptation strategies and biotechnological potential. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, p.871-885, 2002.
23. MEDEIROS, L. A. Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de pseudocaule de bananeira frutífera, 2007. 124 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2007.
24. MELO, H.F. Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação industrial. 2006. 73f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.
25. MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, Preparação, Purificação*. 2º ed. 6º reimpressão. Edgar Blucher Ltda, 1988.
26. MOURO, A. Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.
27. NOGUEIRA, Alessandra B. et al. Aplicação de Planejamento de Experimentos para a Otimização da Extração em Ponto de Nuvem para Determinação de Metais em Maquiagem de Olho. *Revista Virtual de Química*, 2015.

28. NUNES, M. de F. Atividades das enzimas celulase e xilanase durante a decomposição anaeróbia de macrófitas aquáticas. Atividade das enzimas celulase e xilanase durante a decomposição anaeróbia de macrófitas aquáticas. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos. 2010.
29. QUINLAN, Kevin R.; LIN, Dennis KJ. Run order considerations for Plackett and Burman designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, v. 165, p. 56-62, 2015.
30. SAHA, Badal C. et al. Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 92, n. 4, p. 865-874, 2011.
31. SANTOS, J. A. Potencial biotecnológico de fungos marinhos e antárticos da central de recursos microbianos da UNESP (CRM-UNESP). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2015.
32. SIDDIQUI, Khawar Sohail; CAVICCHIOLI, Ricardo. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 75, p. 403-433, 2006.
33. SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis, East Antarctica. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-, v. 90, n. 10, p. 1388, 2006.
34. SINGH, Anita; BISHNOI, Narsi R. Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource technology*, v. 108, p. 94-101, 2012.
35. SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia de Biocombustíveis)- Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010.
36. SOREN, R. Laboratory investigation of stone matrix asphalt using bagasse fiber. 2012. Tese de Doutorado. NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ROORKEA.
37. STEWART, G. G.; RUSSELL, I. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 92, n. 6, p. 537-558, 1986. p.540.
38. VARELLA, D. Candidíase: doenças e sintomas. Disponível em: <<http://drauziovarella.com.br/sexualidade/candidiase/>>. Acesso em: 18 abr. 2015.
39. VIEIRA, D. S. Estrutura, termoestabilidade e atividade de xilanases: um estudo via simulação molecular; Tese (Doutorado em Química) - DQ-FFCLRP-USP, 2003.

## 5. ANEXOS

### 5.1. Anexo 1 - Matriz Codificada Plackett & Burman - 19 ensaios

Matriz Codificada P&B 16 ensaios (9 variáveis - 3 pontos centrais)

|    | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 2  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 3  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  |
| 4  | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  |
| 5  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 |
| 6  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 7  | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 8  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 9  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 10 | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 11 | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 12 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  |
| 13 | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 14 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 15 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 |
| 16 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 17 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 18 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 19 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

### 5.2. Anexo 2 –Matriz Codificada Plackett & Burman - 16 ensaios

Matriz Codificada P&B 12 ensaios (7 variáveis e 4 pontos centrais)

|    | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 2  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 3  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 4  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 5  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 6  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 7  | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  |
| 8  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 9  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 |
| 10 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 11 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 13 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 14 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 15 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 16 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

### 5.3. Anexo 3 – Matriz Codificada Plackett & Burman - 20 ensaios

Matriz Codificada P&B 16 ensaios (9 variáveis - 4 pontos centrais)

|    | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 2  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  |
| 3  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 4  | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | -1 |
| 5  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 6  | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 7  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | -1 |
| 8  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 |
| 9  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 10 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 11 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 1  |
| 12 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  |
| 13 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 14 | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 15 | -1 | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 16 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 17 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 18 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 19 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 20 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

### 5.4. Anexo 4 - Matriz Codificada Plackett & Burman - 12 ensaios

Matriz Codificada P&B 12 ensaios (5 variáveis e 4 pontos centrais)

|    | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  |
|----|----|----|----|----|----|
| 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 2  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 3  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 4  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 5  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  |
| 6  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 7  | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 |
| 8  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 9  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 10 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 11 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 13 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 14 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 15 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 16 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |



Rio Claro, 07/07/2015

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lara Durães Sette

---

Juliana Maíra Freitas Vieira