

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BRUNA LETÍCIA MARTINS

**PRODUÇÃO DE XILANASE FÚNGICA A PARTIR DE
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE CELULOSE: ANÁLISE POR
PLANEJAMENTO FATORIAL**

BAURU
2015

BRUNA LETÍCIA MARTINS

**PRODUÇÃO DE XILANASE FÚNGICA A PARTIR DE
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE CELULOSE: ANÁLISE POR
PLANEJAMENTO FATORIAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

BAURU
2015

Martins, Bruna Leticia

M3865p

Produção de xilanase fúngica a partir de efluentes da indústria de celulose: análise por planejamento fatorial / Bruna Leticia Martins. -- 2015.

50f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Xilanase fúngica. 2. *Aspergillus niger*. 3. Efluentes. 4. Indústria de celulose. 5. Planejamento fatorial. I. Queiroz-Fernandes, Geisiany Maria de. II. Título.

BRUNA LETÍCIA MARTINS

**PRODUÇÃO DE XILANASE FÚNGICA A PARTIR DE
EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE CELULOSE: ANÁLISE POR
PLANEJAMENTO FATORIAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Banca examinadora:

Prof^a.Dr^a. Cynthia Barbosa Rustiguel

Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes

Bauru, 19 de novembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Zildemar e Marlene, pelo cuidado, dedicação e esforço que tiveram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele eu não teria traçado o meu caminho, por iluminar e abençoar minha trajetória.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, pela dedicação e apoio dirigidos a mim, guiando-me pelo “mundo” da pesquisa, posso dizer que minha formação não teria sido a mesma sem você. Obrigada por tudo!

Às amigas que a graduação me trouxe, em especial Gisele e Ana Gabrielle, pelo companheirismo desde o começo dessa jornada.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional que sempre me dedicaram, por terem me proporcionado à chance de realizar essa e muitas outras conquistas, sem vocês nada disso seria possível. A minha irmã, Fernanda, e ao meu namorado, Raoni, pela ajuda, paciência e pelos momentos de descontração.

Às funcionárias do Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração por dividirem suas rotinas comigo, em especial a Lígia pelas várias manhãs de trabalhos juntas. E também a Milena que por várias vezes foi minha companheira de laboratório.

À Universidade do Sagrado Coração pela oportunidade de concluir a graduação.

“O conhecimento serve para encantar as
pessoas, não para humilhá-las.”
(Mario Sérgio Cortella)

RESUMO

O processo de branqueamento da celulose gera grande quantidade de efluentes com baixa biodegradabilidade e que possuem substâncias tóxicas, como o cloro e o ozônio, o que leva a necessidade de tratamentos prévios para o correto descarte. O emprego de xilanases nessa etapa pode reduzir os danos ambientais e diminuir os custos de produção, contribuindo ainda para a obtenção de um produto final de maior qualidade. A produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa para a reutilização de matérias-primas antes consideradas poluentes ambientais. O presente estudo teve por objetivo a produção de xilanase por *A. niger* empregando dois efluentes obtidos nas etapas de branqueamento de uma indústria de celulose do interior de São Paulo, com auxílio do planejamento fatorial, delimitando assim, as condições ideais de produção com variáveis independentes e dependentes. Os experimentos constituíram-se da avaliação das variáveis: concentração de efluente e período de produção. Para tanto, realizou-se controles iniciais de produção por fermentação líquida submersa a partir de meio de cultura previamente descrito na literatura, porém com acréscimo dos efluentes. Esses controles nos permitiram avaliar ainda a capacidade de produção de xilanase pelo fungo *A. niger*, empregado neste estudo, utilizando uma concentração reduzida do indutor xilana (0,5g) em relação aquela descrita previamente em literatura (1,0g), além disso, verificou-se a indução da produção xilanásica do meio com proporcional adição dos efluentes, nesta etapa verificou-se ainda a capacidade de produção de xilanase empregando somente os efluentes. Os resultados destas produções foram avaliados quanto a biomassa determinando-se peso úmido e seco, quantificação da concentração de proteínas pelo método de Bradford, quantificação da atividade xilanásica, segundo metodologia descrita em literatura empregando como substrato a xilana, e cálculos de atividade específica. Observou-se que, nessas condições iniciais, em todas as ocasiões, houve produção de xilanase, até mesmo naquelas em que se utilizaram somente os efluentes. A partir da análise destes resultados, avaliaram-se as variáveis: concentração de efluentes e período de produção ideal, cujos valores foram definidos por meio de planejamento fatorial. As variáveis aplicadas quanto à concentração de efluentes foram 0%, 14%, 50%, 86% e 100% e período de produção foram de 4 a 10 dias. Após a análise destes resultados pelo software STATISTIX 9.0, definiu-se que, a melhor concentração para ambos os efluentes, capaz de induzir a produção de xilanase foi em 50% no período de produção de 7 dias.

Palavras-chaves: xilanase fúngica, *Aspergillus niger*, efluentes, indústria de celulose, planejamento fatorial.

ABSTRACT

The pulp bleaching process generates large amounts of low biodegradability with effluents and that have toxic substances such as chlorine and ozone, which leads to the need for prior treatments for proper disposal, leading to increased costs for this industry. The use of xylanases in this step can reduce environmental damage and reduce production costs, thus contributing to obtaining a final product of higher quality. The production of enzymes from agroindustrial waste is an alternative to reuse of raw materials previously considered environmental pollutants. This study defines the production of xylanase by *A. niger* using the effluent 1 and 2 obtained in steps of bleaching a pulp in the interior of São Paulo, with the aid of experimental design, thus defining the ideal conditions of production with variables independent and dependent. The experiments consisted of the assessment of variables: effluent concentration and production period. Therefore, initial controls carried production by submerged fermentation of liquid medium described previously in the literature culture, but with addition of wastewater. These controls also allow us to evaluate the capacity of xylanase production by the fungus *A. niger* utilized in this study, employing a reduced concentration of xylan inductor (0.5g) in relation to that previously described in the literature (1.0g), furthermore, there was induction of xylanase production of the medium with proportional addition of effluent at this stage still found themselves xylanase production capacity only using the effluent. The results of these productions were evaluated as biomass determining wet and dry weight, quantification of protein concentration by the Bradford method, quantification of xylanase activity according to the methodology described in the literature using xylan as a substrate, and the specific activity calculations. It was observed that under these initial conditions, at all times, there xylanase production, even those in which only the effluent is used. From the analysis of these results, we evaluated the variables: concentration of effluents and ideal production period, whose values were defined through of factorial design. Variables applied as the concentration of effluent were 0%, 14%, 50%, 86% and 100%, production period were 4 to 10 days. After examining these results by software Statistix 9.0, it was decided that the best concentration for both effluent able to induce xylanase production was 50% in 7 days production period.

Keywords: fungal xylanase, *Aspergillus niger*, effluents, cellulose industry, factorial experiment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de ação da xilanase	14
Figura 2 - Raspagem de células fúngicas para ressuspensão, contagem e ajuste do inóculo.....	22
Figura 3 - Incubação dos controles iniciais de produção em agitador orbital a 30°C e 100 rpm	24
Figura 4 - Leitura em espectrofotômetro da concentração de proteínas e atividade	27
Figura 5 - Gráfico de Pareto referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 1 ...	32
Figura 6 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 1	32
Figura 7 - Gráfico de Pareto referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 1	33
Figura 8 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 1	34
Figura 9 - Gráfico de Pareto referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 2 ...	36
Figura 10 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 2	36
Figura 11 - Gráfico de Pareto referente a atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 2	37
Figura 12 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 2	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos controles iniciais de produção	23
Tabela 2 - Composição dos tratamentos segundo planejamento fatorial	25
Tabela 3- Resultados obtidos com a variação da xilana no meio de cultura empregado na produção de xilanase	28
Tabela 4 - Resultados obtidos nos controles iniciais de produção com o efluente 1	29
Tabela 5- Resultados obtidos nos controles iniciais de produção com o efluente 2	29
Tabela 6 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento	29
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial	30
Tabela 8 - Resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica obtidos com o emprego do efluente 1 a partir do delineamento do planejamento fatorial	31
Tabela 9 - Resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica obtidos com o emprego do efluente 2 a partir do delineamento do planejamento fatorial	35
Tabela 10 - Atividade xilanásica e atividade específica dos efluentes 1 e 2 referente a validação com parâmetros fixados pelo planejamento fatorial	38
Tabela 11 - Peso úmido e seco da biomassa obtida dos controles iniciais de produção.....	39
Tabela 12 - Peso úmido e seco da biomassa obtida dos tratamentos realizados com efluente 1	39
Tabela 13 - Peso úmido e seco da biomassa obtida dos tratamentos realizados com efluente 2	40
Tabela 14: Peso úmido e seco da biomassa obtida na validação	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 XILANASE	16
2.2 INDÚSTRIA DE CELULOSE	16
2.3 MEIO AMBIENTE E A BIOTECNOLOGIA	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAIS.....	20
4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura	20
4.1.2 Equipamentos	20
4.2 METODOLOGIA	21
4.2.1 Micro-organismo	21
4.2.2 Concentração do inóculo	21
4.2.3 Obtenção e características dos efluentes da indústria de celulose	21
4.2.4 Otimização da produção de xilanase a partir de efluentes da indústria de celulose	22
4.2.5 Controles iniciais de produção	22
4.2.6 Planejamento fatorial	23
4.2.7 Validação	24
4.2.8 Recuperação da enzima	24
4.2.9 Métodos analíticos	25
4.2.9.1 <i>Determinação do coeficiente de extinção molar</i>	25
4.2.9.2 <i>Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford</i>	25
4.2.9.3 <i>Determinação da atividade xilanásica</i>	25
4.2.10 Determinação de peso úmido e peso seco	26
5 RESULTADOS	27
5.1 CONTROLES INICIAIS DE PRODUÇÃO	27
5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL	28
5.2.1 Efluente 1	30
5.2.1.1 <i>Atividade xilanásica</i>	30

5.2.1.2 Atividade específica.....	32
5.2.2 Efluente 2	33
5.2.2.1 Atividade xilanásica	33
5.2.2.2 Atividade específica.....	35
5.3 VALIDAÇÃO.....	37
5.4 DETERMINAÇÃO DE PESO ÚMIDO E PESO SECO	37
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas apresentam forte potencial de aplicação na indústria, pois suas características favorecem os processos bioquímicos industriais, não produzem resíduos indesejáveis e é a principal alternativa para a substituição de produtos químicos poluentes, uma vez que são agentes seguros ao meio ambiente, além de serem considerados biocatalisadores específicos (SHARMA e KUMAR, 2013; ADESINA e ONILUDE, 2013).

A obtenção de enzimas com fins industriais ocorre por meio de processos fermentativos, que podem ser sólidos ou submersos, sendo a última a mais utilizada pelas grandes indústrias produtoras de enzimas. Nesse caso, o cultivo acontece em meio de cultura líquido com condições de temperatura, pH, substratos e agitação rigorosamente controlados, e posteriormente passam por processos de filtração ou centrifugação, quantificação e purificação para obtenção do produto final (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Enzimas microbianas apresentam forte potencial de aplicação na indústria, pois suas características favorecem os processos bioquímicos industriais, não produzem resíduos indesejáveis e são a principal alternativa para a substituição de produtos químicos poluentes, uma vez que são agentes seguros ao meio ambiente, além de serem considerados biocatalisadores específicos (SHARMA e KUMAR, 2013; ADESINA e ONILUDE, 2013).

Segundo Polizeli et al. (2005) a principal fonte comercial para a produção de enzimas são os fungos filamentosos, que apresentam grande habilidade para a secreção de enzimas extracelulares. As enzimas fúngicas apresentam vantagens de aplicação, pois são produzidas a partir de substratos de origem renovável como, por exemplo, resíduos agroindustriais, possuem alto poder catalítico sendo mais eficiente que outros catalisadores inorgânicos, têm maior especificidade, são produtos biológicos completamente biodegradáveis e de baixo custo de obtenção (GORDON et al., 2000; ALENCAR GUIMARAES et al., 2013).

Os fungos filamentosos são os mais empregados pelas indústrias para a produção das xilanases, pois altos níveis dessa enzima, e de enzimas hidrolíticas auxiliares, são secretados para o meio extracelular tendo, portanto, maior rendimento e níveis de produção mais elevados em relação a outros micro-organismos, sendo que os gêneros mais empregados para este fim são os *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* Existem vários relatos de xilanase fúngica produzidas por diferentes espécies destes gêneros como: *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus* (BETINI et al., 2009), *T. reesei*, *T. harzianum*, *T. lanuginosus* (SEYIS, 2003; BAJPAI, 2004; SHAH e MADAMWAR, 2005; OKAFOR et al., 2007; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Xilanases (E.C.3.2.1.8) são enzimas hidrolíticas responsáveis pela clivagem da xilana, que por sua vez, é um importante componente estrutural de polissacarídeo hemicelulolítico encontrado nas paredes celulares vegetais, sendo a enzima de despolimerização da xilana através da hidrólise da espinha dorsal do xilano em pequenos oligossacarídeos, esse mecanismo está representado na Figura 1 (NINAWA et al. 2008, GUPTA e KAR, 2009).

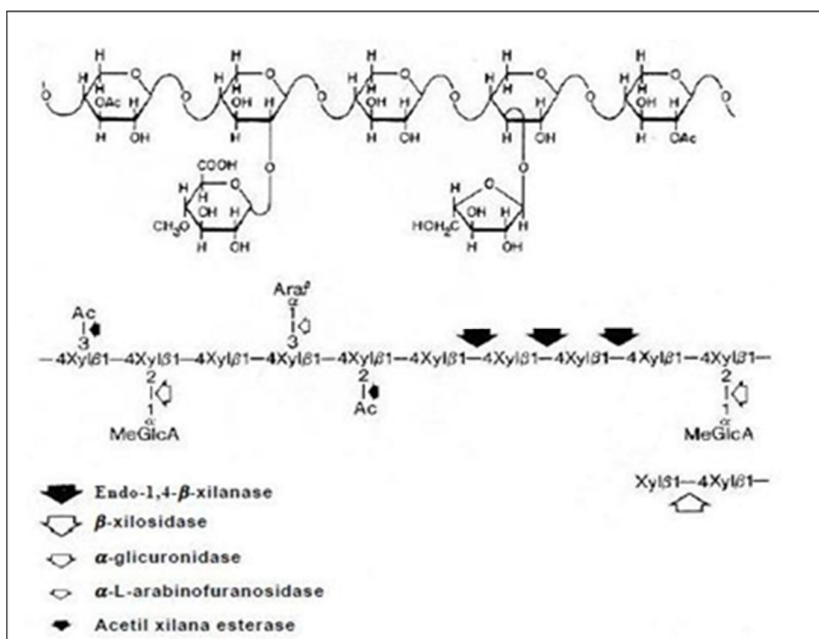


Figura 1- Mecanismo de ação da xilanase.
Fonte: Querido 2002, adaptado pela autora

São conhecidos como indutores de xilanases, principalmente, a xilose e o xilano. Esses indutores são economicamente dispendiosos para a produção dessa enzima em larga escala e a substituição desses por resíduos ou efluentes industriais, que contenham tais indutores, apresenta-se como uma importante opção de fontes de carbono para a obtenção da mesma (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002).

O potencial industrial das xilanases inclui a bioconversão de lignocelulose em bicomustível (LI et al., 2007), melhoria da qualidade de ração animal (SHAH e MADAMWAR, 2005; BAKRI et al., 2008), fabricação de cervejas, aplicação têxtil (FU et al., 2012), clarificação de vinho (MUTHEZHILAN et al., 2007), biorremediação (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; MTUI, 2012), indústria de alimentos (OZEKI et al., 2010) e panificação (NINAWA et al., 2008), ainda podem ser usadas em associação com outras enzimas. Além disso, as xilanases apresentam grande aplicabilidade na indústria de

papel e celulose, onde são usadas nas etapas de branqueamento da polpa de celulose. Espera-se que as xilanases para essa finalidade possuam características específicas como termoestabilidade, pH alcalino e que sejam livres de celulases, possibilitando a preservação das fibras da celulose (COLLINS et al., 2005; LI et al., 2007; FANG et al., 2007; BAKRI et al., 2008).

A endo-1,4- β -xilanase é muito utilizada na indústria de celulose, pois essa enzima atua na remoção da xilana da pasta de celulose tornando sua fibra mais permeável sendo importante para a utilização do material lignocelulósico, facilitando a liberação da lignina, melhorando o branqueamento da polpa Kraft (processo tecnológico de obtenção da polpa) (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; SHARMA e KUMAR, 2013).

Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose (xilana) e lignina. As fibras de celulose são formadas, principalmente, pela ligação covalente entre a lignina e a hemicelulose, que confere uma cor acastanhada a pasta, e é essa ligação lignina-xilana que é degradada pela xilanase, reduzindo assim o uso de produtos químicos, principalmente o ozônio e o dióxido de cloro, agentes de branqueamento comumente empregados. A utilização da xilanase nesse processo pode contribuir para a redução de custos, obtenção do papel com melhor qualidade e, especialmente, conservação do meio ambiente, uma vez que, leva a diminuição da utilização de compostos químicos que são classificados como agravantes dos problemas ecológicos por resistirem a degradação, serem tóxicos e carcinogênicos (RAGHUKUMAR et al., 2004; DOBREV et al., 2007; EBRAHIMI, 2010; EIDA et al., 2011).

O setor industrial, visando menos custos prioriza o uso de resíduos agroindustriais e a utilização de substratos lignocelulósicos para a produção da xilanase (MUTHEZHILAN et al., 2007; BISWAS et al., 2010). A indústria de celulose tem grande importância em todo o mundo, no entanto se destaca também por seus processos de produção gerarem efluentes residuais, que apresentam baixa biodegradabilidade, contendo compostos orgânicos e inorgânicos, sendo, portanto, necessários tratamentos prévios para o descarte (OKAFOR et al., 2007; VERMA, 2011; JUSTINO et al., 2011; KAMALI e KHODAPARAS, 2014).

Pesquisas biotecnológicas buscam, cada vez mais, a preservação ambiental, se preocupando com subprodutos tóxicos e procurando aplicar tecnologias sustentáveis de reutilização. O bioetanol de segunda geração é um exemplo biotecnológico do uso de fontes alternativas a fim de minimizar a poluição ambiental, pois prioriza a utilização de fontes renováveis, utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, ou seja, resíduos agrícolas como a palha de milho, bagaço de cana, dentre outros (TAN et al., 2010;

DEENANATH et al., 2012; EL-TAYEB et al., 2012; MERAYO et al., 2013; PÉREZ-RODRIGUES et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 XILANASE

As xilanases ganharam notoriedade na indústria de papel e celulose desde meados de 1980, e nos últimos anos apresentou maior aplicação no setor. O emprego da xilanase no processo de branqueamento proporciona uma redução na demanda de produtos químicos clorados e conseqüentemente a redução de compostos organoclorados nos efluentes resultantes. Segundo Sharma et al. (2014), com o emprego do tratamento enzimático é possível atingir uma tecnologia mais limpa nesse setor (BAJPAI, 2004; COLLINS et al., 2005; FANG et al., 2007; BAE et al., 2008; BAKRI et al., 2008; KAUR et al., 2010; VERMA E SATYANARAYANA, 2013; SHARMA et al., 2014).

Prezando a necessidade do baixo custo, visada sempre pelo setor industrial, a utilização de xilana para produção de xilanase em larga escala comercial não é rentável devido ao alto custo desse substrato. Se contrapondo a esse fato a biotecnologia industrial propõe o emprego de resíduos industriais e agrícolas, que contenham xilana como substrato de baixo custo minimizando os custos de produção e, além disso, a otimização do meio de fermentação também apresenta sua importância para redução de custos (SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002; FANG et al., 2007; OKAFOR et al., 2007; BAKRI et al., 2008; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2014).

2.2 INDÚSTRIA DE CELULOSE

Segundo Chandra e Sankhwar (2011), a fim de satisfazer a alta demanda atual, a indústria de papel e celulose se tornou a sexta maior na geração de efluentes no mundo. Isso se deve ao processo de polpação Kraft, que exige o branqueamento da polpa acastanhada com substâncias químicas, capazes de reagir com a lignina, gerando subprodutos que devem ser previamente tratados para a realização do descarte, o que adiciona custos ao processo. É certo que o branqueamento químico é um grande problema ambiental e também do respectivo setor industrial. Visando uma melhora dessa problemática, o biobranqueamento com xilanase se destaca como um bioprocessos favorável economicamente e, principalmente, à preservação do meio ambiente (BAJPAI, 2004; CHANDRA e SANKHWAR, 2011; KHONZUE et al., 2011; GOLUGURI et al., 2012; WEERACHAVANGKUL et al., 2012).

Nesse contexto, as pesquisas biotecnológicas que buscam melhorar os processos de obtenção de xilanases, que sejam cada vez mais eficientes em degradar lignocelulose,

acrescentando-se, ainda, a possibilidade do emprego de efluentes gerados por esse mesmo setor industrial têm grande relevância econômica e ambiental (AHLAWAT et al., 2007; MERAYO et al., 2013; PÉREZ-RODRIGUES et al., 2014).

2.3 MEIO AMBIENTE E A BIOTECNOLOGIA

Sustentabilidade e preservação ambiental são, atualmente, questões de grande importância e destaque. Nas últimas décadas a grande geração de resíduos industriais, sejam líquidos ou sólidos, apresentou exponencial aumento em todos os setores da indústria, o que tem levado a crescentes preocupações em minimizar os impactos ambientais. O desenvolvimento de processos biotecnológicos que reutilizam esses resíduos empregando-os novamente nas etapas de produção, agregando ainda valor comercial ao que antes era descartado, resulta em processos sustentáveis e menos poluentes (AHLAWAT et al., 2007; WU et al., 2009; MERAYO et al., 2013).

Seguindo esta perspectiva, pode-se citar como exemplo de processo biotecnológico sustentável, a produção de bioetanol uma vez que o setor energético se apresenta como um campo desafiador com grande aplicabilidade para o desenvolvimento de processos biotecnológicos em razão do recurso energético ser em grande parcela provindo de combustíveis fósseis esgotável, representado especialmente pelo petróleo. A substituição destas por fontes renováveis fez-se necessária e impulsionou tecnologias bioenergéticas resultando como principal produto os biocombustíveis, em particular o bioetanol. O bioetanol apresenta-se como uma alternativa ao uso do petróleo e também a redução da poluição ambiental provinda da queima dos combustíveis fósseis (GLITHERO et al., 2013; CHEN et al., 2014; LENNARTSSON et al., 2014; BHATTACHARYA et al., 2015).

Atendendo também a questão da preservação ambiental desenvolveu-se o bioetanol de segunda geração que emprega biomassa lignocelulósica, baseando-se na bioconversão de resíduos de celulose, antes acumulados e poluentes, em açúcares fermentáveis por meio de micro-organismos que atuam realizando hidrólise enzimática desses resíduos com etapas precedentes de fermentação e destilação (EL-TAYEB et al., 2012; GLITHERO et al., 2013; LENNARTSSON et al., 2014; SAINI et al., 2015).

A indústria de alimentos é outro campo onde a biotecnologia se encontra em expansão devido a geração de grandes quantidades de resíduos provenientes de seus processos industriais. Um exemplo de sua influência positiva é o emprego alternativo de resíduos de soro de queijo, que por ser constituído por lactose demanda tratamento prévio antes do

descarte para o meio ambiente, em matéria-prima para bioprocessos resultantes em compostos intermediários de biocombustíveis como, por exemplo, a sua fermentação a ácidos e posteriormente para biogás, além de outras aplicabilidades de reutilização (ELLIS et al., 2014; MUÑOZ-PÁEZ et al., 2014; STAMATELATOU et al., 2014).

O panorama da atuação da biotecnologia nesses campos é um demonstrativo do potencial cada vez maior do emprego de resíduos e/ou efluentes industriais em processos de grande importância comercial (HULL et al., 2014; VENTORINO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho de pesquisa tem como objetivo a produção de xilanase fúngicas, de interesse industrial, a partir de efluentes gerados por uma indústria de celulose da região de Bauru/SP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as variáveis, concentração de efluentes e período de incubação, na produção de xilanase empregando efluentes da indústria de celulose.

- Avaliar estes resultados por planejamento fatorial empregando o software Statistix 9.0 e definir as melhores condições de produção quanto a essas variáveis utilizando os efluentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes, reagentes e meio de cultura

Ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol (SDA+C) - Acumedia

Cloreto de potássio (KCl) - CAAL

Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄) - Dinâmica

Fosfato de amônio [(NH₄)₂ HPO₄] - Reagen

Fosfato monossódico (NaH₂PO₄) - Reagen

Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂) - Vetec

Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄) - Nuclear

Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄) - Dinâmica

Xilana - Sigma-Aldrich

Reagente de Bradford - Sigma-Aldrich

Ácido 3,5 dinitrosalicílico - Vetec

Hidróxido de sódio - Dinâmica

Tartarato de sódio e potássio - Neon

Metabissulfito de sódio - Reagen

Fenol - Dinâmica

4.1.2 Equipamentos

Shaker- Tecnal TE 420

Fluxo Laminar- VECO

Estufa micológica- Fanem

Banho maria- FANEM

Microscópio- Nikon E 100

Espectrofotômetro-BEL

Autoclave vertical- PhoenixVidrarias

Pipetas de volume variável

Ponteiras

Tubos Falcon

Espátulas

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Micro-organismo

Para a realização da produção de xilanase foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*(IOC/CCFF 3998), doado pelo Instituto Oswaldo Cruz. A manutenção deste fungo (com repiques quinzenais) e crescimento para realização dos experimentos se deu em meio ágar Sabouraud a 28°C por 7 dias em estufa micológica.

4.2.2 Concentração do inóculo

Para o ajuste da concentração do inóculo procedeu-se, em cabine de segurança biológica e zona asséptica do bico de Bunsen com auxílio de espátulas previamente esterilizadas, à raspagem das células fúngicas, para a ressuspensão em água previamente esterilizada e diluição, conforme demonstrado na Figura 2. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração 10^7 esporos/mL, utilizada em todas as produções.

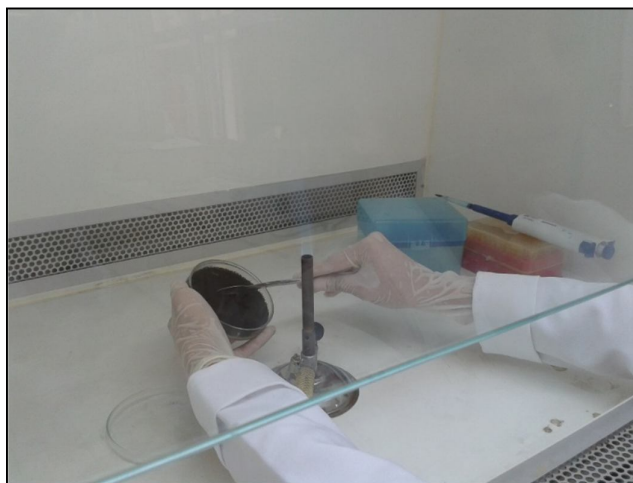


Figura 2 - Raspagem de células fúngicas para ressuspensão, contagem e ajuste do inóculo.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 Obtenção e características dos efluentes da indústria de celulose

Foram cedidos dois efluentes líquidos de características diferentes por uma indústria de celulose do interior do Estado de São Paulo. O efluente 1 possui característica ácida e o

efluente 2 característica alcalina, estes foram coletados no primeiro e segundo estágio do processo de branqueamento, respectivamente, no segundo semestre de 2014.

4.2.4 Otimização da produção de xilanase a partir de efluentes da indústria de celulose

A produção de xilanase foi realizada por meio da fermentação líquida submersa (SmF), em agitador orbital empregando inicialmente o meio de cultura descrito na literatura por Nair et al. (2008) constituído de KCl 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂HPO₄ 2,5; NaH₂PO₄ 0,5; CaCl₂.2H₂O 0,01; FeSO₄.7H₂O 0,01; ZnSO₄.7H₂O 0,002 e xilana 1,0 (g.L⁻¹).

4.2.5 Controles iniciais de produção

Para definição dos primeiros parâmetros, buscando a otimização e a redução do gasto do indutor xilana, foram realizados experimentos iniciais com os dois efluentes. Estes controles iniciais sofreram variação nos valores de concentração de efluentes (0%, 50% e 100%) acrescidos ao meio de cultura e também da quantidade de xilana (1,0g e 0,5g), como representado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos controles iniciais de produção.

Controles iniciais	Meio de cultura (%)	Efluente 1 (%)	Efluente 2 (%)
1,0g xilana	100	0	0
0,5g xilana	100	0	0
Positivo1 (50%)	50	50	0
Positivo 2(50%)	50	0	50
Positivo1 (100%)	0	100	0
Positivo 2(100%)	0	0	100

Fonte: Elaborado pela autora.

Os controles foram realizados em triplicatas, com volume final de 50 mL de meio em erlenmeyers de 125 mL de volume, o pH inicial foi ajustado para 5,0 e foi novamente aferido após o processo de autoclavagem, empregou-se inóculo de 10^7 esporos/mL, e a produção foi incubada em agitador orbital por 7 dias à 30°C sob agitação constante de 100 rpm, conforme Figura 3.



Figura 3 - Incubação dos controles iniciais de produção em agitador orbital a 30°C e 100 rpm.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.6 Planejamento fatorial

Após a realização dos controles iniciais de produção e análise dos dados obtidos aplicou-se o planejamento fatorial, encontrando-se as variáveis da otimização quanto a concentração dos efluentes e período de incubação, que foram definidas em 11 tratamentos diferentes para ambos os efluentes, conforme demonstrado na Tabela 2. Como os dados prévios obtidos dos controles iniciais mostraram que o fungo *A. niger* era capaz de produzir xilanase com considerável atividade mesmo empregando o indutor xilana na metade da concentração utilizada por Nair et al. (2008), para a realização de todos os ensaios posteriores ao planejamento fatorial, empregou-se a xilana na concentração de 0,5g.

Tabela 2 - Composição dos tratamentos segundo planejamento fatorial.

Tratamento	Concentração efluente		Concentração do meio de cultura (%)	Período de incubação	
	Valores reais (%)	Valores codificados		Valores reais (dias)	Valores codificados
1	14	-1,00	86	5	-1,00
2	14	-1,00	86	9	1,00
3	86	1,00	14	5	-1,00
4	86	1,00	14	9	1,00
5	50	0,00	50	7	0,00
6	50	0,00	50	7	0,00
7	50	0,00	50	7	0,00
8	50	0,00	50	4	-1,41
9	50	0,00	50	10	1,41
10	0	-1,41	100	7	0,00
11	100	1,41	0	7	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.7 Validação

Com a análise dos dados obtidos por planejamento fatorial onde encontrou-se a concentração dos efluentes e o período de produção que melhor favoreceram a produção de xilanase, realizou-se novo ensaio reproduzindo, em duplicatas, as variáveis ótimas de 50% de concentração para os dois efluentes em relação ao meio de cultura com período de produção de 7 dias, sendo que tais condições foram fixadas para os ensaios posteriores. Para a validação os demais parâmetros de produção foram pH 5,0; 30°C sob agitação constante de 100 rpm, conforme descrito por Nair et al. (2008).

4.2.8 Recuperação da enzima

Após as produções os extratos enzimáticos foram recuperados por meio de filtração a vácuo em papel de filtro de 0,45 µm para separação da biomassa produzida. O filtrado foi armazenado a -20°C para as posteriores análises e a biomassa recuperada.

4.2.9 Métodos analíticos

4.2.9.1 Determinação do coeficiente de extinção molar

As determinações da concentração de proteínas e de atividade xilanásica foram fundamentadas em soluções-padrão específicas. Para a determinação da concentração de proteínas foi empregada uma solução de soro albumina bovino, em concentrações que variaram de 0,1 a 2mg/mL, e para a determinação da atividade xilanásica empregou-se solução-padrão de xilose com concentrações que variam de 100 a 700µg/mL. As soluções padrão passaram pelos mesmos procedimentos dos extratos brutos, como descrito no item 3.9 e 3.10. A determinação do coeficiente de extinção molar foi baseada na lei de Lambert-Beer, onde o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra (µmols/mL) foi traçado, determinando-se o coeficiente angular. O coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado a partir da seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, em que A = Absorbância, ϵ = absortividade, b = caminho óptico (1 cm) e c = concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. O valor de ϵ encontrado na curva analítica de albumina de soro bovino foi igual a 0,0007 e para a curva analítica de xilose igual a 0,34.

4.2.9.2 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

Foram adicionados a tubos de ensaio, conforme orientação do fabricante, 50 µL das amostras a serem dosadas e 1,5 mL do reagente de Bradford, adquirido comercialmente. Esta mistura foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente e procedeu-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro, conforme Figura 4, zerando o aparelho com o branco da reação constituído de 1,5 mL do reagente de Bradford e 50 µL de tampão. As proteínas foram quantificadas empregando-se a curva analítica de soro albumina bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

4.2.9.3 Determinação da atividade xilanásica

A atividade xilanásica foi determinada segundo método descrito por Nair et al. (2008), utilizando como substrato a xilana, para tanto preparou-se uma solução de 900 µL de xilana a 1% em tampão citrato de sódio 50mM e pH 5,3, em seguida adicionou-se a 100µL do extrato bruto enzimático, a reação foi incubada a 50°C durante 5 min. Após este período a reação foi parada pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e fervura a 100°C durante

5 min. O branco foi preparado conforme procedimento empregado para os tratamentos, exceto pela adição do extrato enzimático que passou por processo prévio de desnaturação.

Após arrefecimento realizou-se leitura a 540 nm em espectrofotômetro, conforme ilustrado na Figura 4. A quantidade de açúcares redutores liberados foram quantificados utilizando como padrão a xilose. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{absorbância (540 nm)} \times \text{vol. ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de xilose por minuto conforme as condições experimentais.



Figura 4 - Leitura em espectrofotômetro da concentração de proteínas e atividade.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.10 Determinação de peso úmido e peso seco

Determinou-se o peso úmido da biomassa produzida com auxílio de balança analítica e o peso seco foi mensurado da mesma maneira, após secagem em estufa a 37°C até a obtenção de peso constante.

5 RESULTADOS

5.1 CONTROLES INICIAIS DE PRODUÇÃO

Os resultados obtidos nos controles iniciais de produção contribuíram para a definição dos valores das variáveis empregadas nos experimentos de planejamento fatorial e estão representados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de produção resultante da variação da concentração do indutor xilana no meio descrito por Nair et al. (2008) sem o acréscimo de qualquer volume de efluentes. A capacidade de produção do meio de cultura foi verificada quanto à redução de 50% da quantidade de xilana utilizada originalmente pelos autores e essa modificação apresentou resultado positivo, pois se verificou que, mesmo com a redução do indutor pela metade, ainda sim houve produção de xilanase com considerável atividade específica (117,36 U/mg). Estes resultados se mostraram promissores uma vez que podem levar diretamente a redução de custos de produção e por isso todos os ensaios subseqüentes realizados no planejamento fatorial foram conduzidos empregando-se a xilana na concentração de 0,5 g.

Tabela 3- Resultados obtidos com a variação da xilana no meio de cultura empregado na produção de xilanase.

Controles iniciais de produção	Concentração de proteínas (mg/mL)*	Atividade de xilanase (U/min/mL)*	Atividade específica (U/mg)*
1 g xilana	0,062	4,59	74,03
0,5g xilana	0,057	6,69	117,36

*valores obtidos da média de triplicatas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados observados em relação ao efluente 1 quanto a sua concentração em função do seu acréscimo ao meio de cultura, enquanto na Tabela 5 estão representados os resultados pertinentes ao efluente 2. Pode-se observar que a produção enzimática de xilanase foi satisfatória com o emprego de ambos os efluentes até mesmo quando somente estes foram utilizados, porém o melhor desempenho na produção ocorreu na concentração de 50% dos efluentes 1 e 2 em relação ao meio de cultura mesmo com 0,5g de xilana.

Tabela 4 - Resultados obtidos nos controles iniciais de produção com o efluente 1.

Concentração de efluente (%)	Concentração de proteínas (mg/mL)*	Atividade de xilanase (U/min/mL)*	Atividade específica (U/mg)*
50	0,052	6,12	117,69
100	0,055	0,33	6

*valores obtidos da média de triplicatas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5- Resultados obtidos nos controles iniciais de produção com o efluente 2.

Concentração de efluente (%)	Concentração de proteínas (mg/mL)*	Atividade de xilanase (U/min/mL)*	Atividade específica (U/mg)*
50	0,086	2,92	33,95
100	0,076	0,61	8,02

*valores obtidos da média de triplicatas.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL

As especificações dos níveis das duas variáveis utilizadas no planejamento de delineamento composto central rotacional (DCCR) dos tratamentos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Especificação dos níveis das variáveis usadas no planejamento.

Variáveis	2 níveis				
	-1,414214	-1	0	1	1,414214
Período de produção(dias)	4	5	0	9	10
Efluente (%)	0	14	50	86	100

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Tabela 7 estão representadas a análise de variância do planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais e axiais para a produção de xilanase pelo fungo *A. niger* empregando os efluentes 1 e 2.

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial.

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste $F_{calc}F_{list}$
U/mL ^a	Modelo	61,45	3	20,48	55,354,35 b
	Resíduo	2,59	7	0,37	
	Total	64,04	10		
U/mg ^c	Modelo	3761,19	3	1253,73	44,463,07 d
	Resíduo	197,41	7	28,20	
	Total	3958,60	10		
U/mL ^e	Modelo	42,67	3	14,22	142,204,35 f
	Resíduo	0,70	7	0,10	
	Total	43,37	10		
U/mg ^g	Modelo	176834,3	2	88417,15	20,564,46 h
	Resíduo	34406,7	8	4300,84	
	Total	211241,0	10		

^aR² = 0,96; ^bF 95%.3,7; ^cR² = 0,95; ^dF 90%.3,7; ^eR² = 0,98; ^fF 95%.3,7; ^gR² = 0,84; ^hF 95%.2,8
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.1 Efluente 1

5.2.1.1 Atividade xilanásica

Na Tabela 8 estão representados os resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica calculados para cada tratamento com o efluente 1 de acordo com parâmetros da otimização estabelecidos no planejamento fatorial.

Tabela 8 - Resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica obtidos com o emprego do efluente 1 a partir do delineamento do planejamento fatorial.

Tratamento	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade xilanásica (U/min/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	0,127	6,07	47,7
2	0,130	4,82	37,0
3	0,150	0,36	2,4
4	0,133	1,09	8,2
5	0,136	5,41	39,7
6	0,165	6,84	41,4
7	0,159	5,72	35,9
8	0,130	4,31	33,1
9	0,142	4,39	30,9
10	0,107	6,98	65,2
11	0,145	0,05	0,34

Fonte: Elaborado pela autora.

O planejamento desenvolvido para o efluente 1 referente a atividade xilanásica (U/min/mL) apresentou R^2 de 0,96 (Tabela 7), sendo que a influência das variáveis analisadas foi significativa, pois o valor de p foi $\leq 0,05$. Quando os níveis foram inferiores para as variáveis: concentração de efluente e período de produção houve maior produção de xilanase pelo fungo *A. niger*, ou seja, grandes volumes de efluentes e longos períodos de cultivos não favoreceram a produção enzimática, conseqüentemente uma menor concentração de efluente aumentou a produção enzimática (Figura 7). O F-calculado foi de 55,35, ou seja, 12,72 vezes maior que F-tabelado (4,35). Na Figura 8 pode ser observado o gráfico de

superfície de resposta. A equação que descreve o modelo para este planejamento é: $z=5,99-0,051.x-1,04.x^2-2,41.y-1,46.y^2+0,49.x.y$.

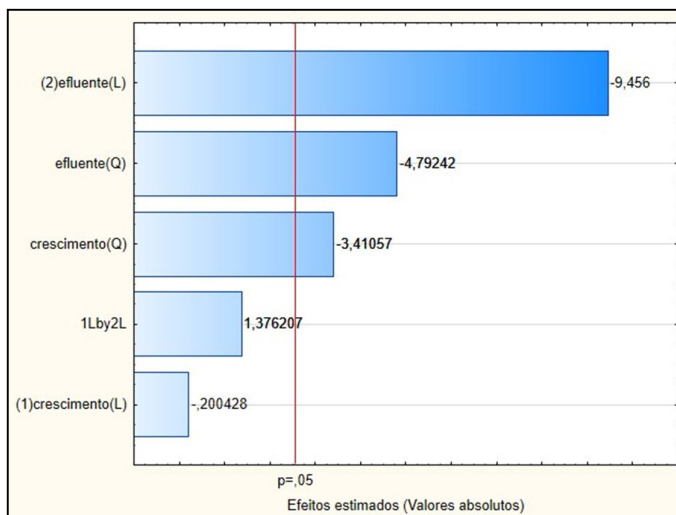


Figura 5 - Gráfico de Pareto referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 1.

Fonte: Elaborado pela autora.

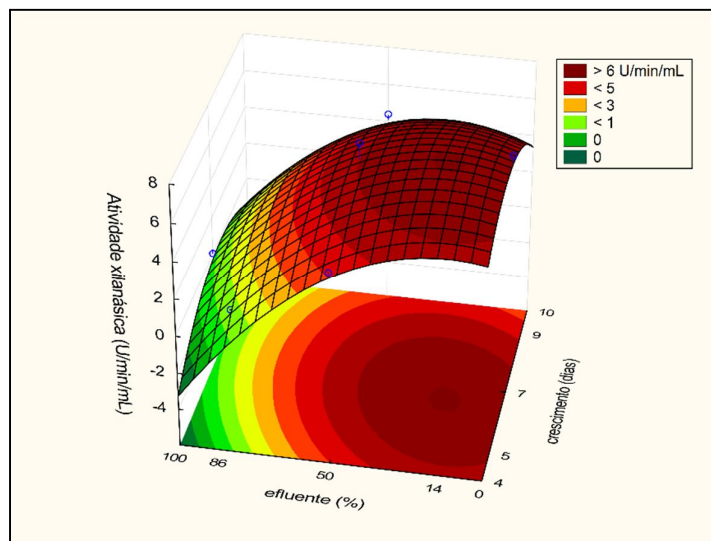


Figura 6 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 1.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.1.2 Atividade específica

O planejamento desenvolvido para o efluente 1 referente a atividade específica (U/mg) apresentou R^2 de 0,95 (Tabela 7), verificou-se significância para as variáveis efluente e crescimento, no nível linear e no nível quadrático, cujo o valor de p foi $\leq 0,1$. Quando os níveis foram inferiores para as variáveis: concentração de efluente e período de produção, houve maior produção de xilanase pelo fungo *A. niger*, ou seja, grandes volumes de efluentes e longos períodos de cultivo, não favoreceram a produção enzimática, consequentemente uma menor concentração de efluente aumentou a produção enzimática (Figura 7). O F-calculado foi de 44,46, ou seja, 14 vezes maior que F-tabelado (3,07). Na Figura 8 pode ser observado o gráfico de superfície de resposta. A equação que descreve o modelo para este planejamento é: $z=39,15-0,98 x-5,71.x^2-20,70.y-5,40.y^2 + 4,10.x.y$.

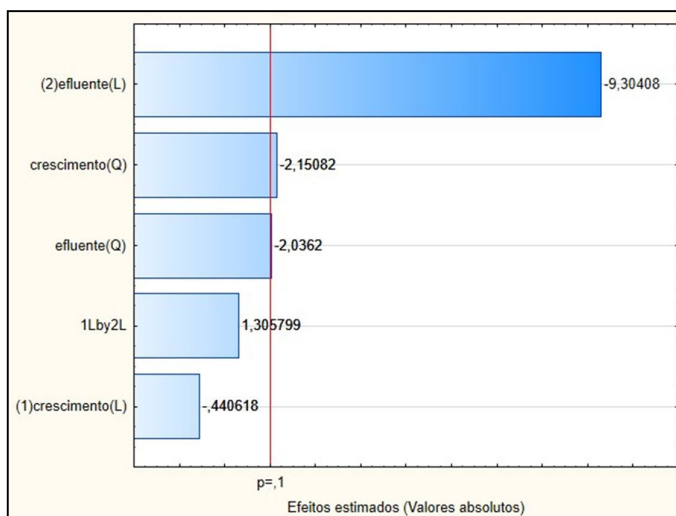


Figura 7 - Gráfico de Pareto referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 1.

Fonte: Elaborado pela autora

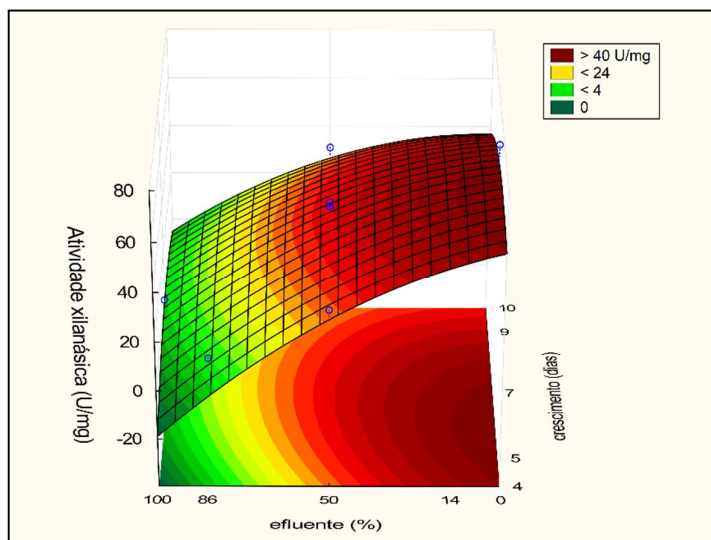


Figura 8 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 1.

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.2 Efluente 2

5.2.2.1 Atividade xilanásica

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica calculados para cada tratamento com o efluente 2 de acordo com parâmetros da otimização estabelecidos no planejamento fatorial.

Tabela 9 - Resultados de concentração de proteínas, atividade xilanásica e atividade específica obtidos com o emprego do efluente 2 a partir do delineamento do planejamento fatorial.

Tratamento	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade xilanásica (U/min/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	0,036	6,71	186,3
2	0,039	5,62	144,1
3	0,042	2,54	60,4
4	0,025	1,71	68,4
5	0,170	4,97	29,2
6	0,013	4,06	312,3
7	0,010	4,52	452
8	0,170	5,55	32,6
9	0,187	3,89	20,8
10	0,219	6,86	31,3
11	0,202	0,153	0,75

Fonte: Elaborado pela autora.

O planejamento referente à atividade xilanásica (U/min/mL) desenvolvido para o efluente 2 apresentou R^2 de 0,98 (Tabela 7), verificou-se significância para as variáveis efluente, no nível linear e quadrático. Já a variável período de produção foi significativa apenas no nível linear, cujo valor de p foi $\leq 0,05$. Quando os níveis foram inferiores para as variáveis: concentração de efluente e período de produção houve maior produção de xilanase pelo fungo *A. niger*, ou seja, grandes volumes de efluentes e longos períodos de cultivos não favoreceram a produção enzimática, conseqüentemente uma menor concentração de efluente aumentou a produção enzimática (Figura 9). O F-calculado foi de 142,20, ou seja, 33 vezes maior que F-tabelado (4,35). Na Figura 10 pode ser observado o gráfico de superfície de resposta. A equação que descreve o modelo para este planejamento é: $z=4,52-0,53.x+0,11.x^2-2,20.y-0,50.y^2+0,06.x.y$.

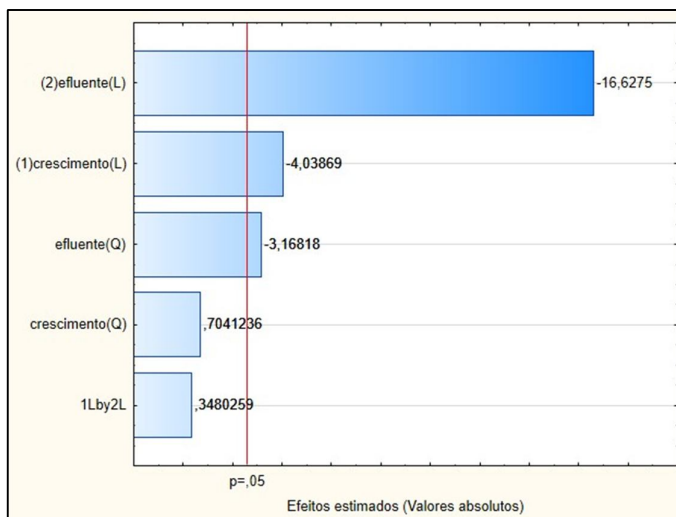


Figura 9 - Gráfico de Pareto referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 2.

Fonte: Elaborado pela autora.

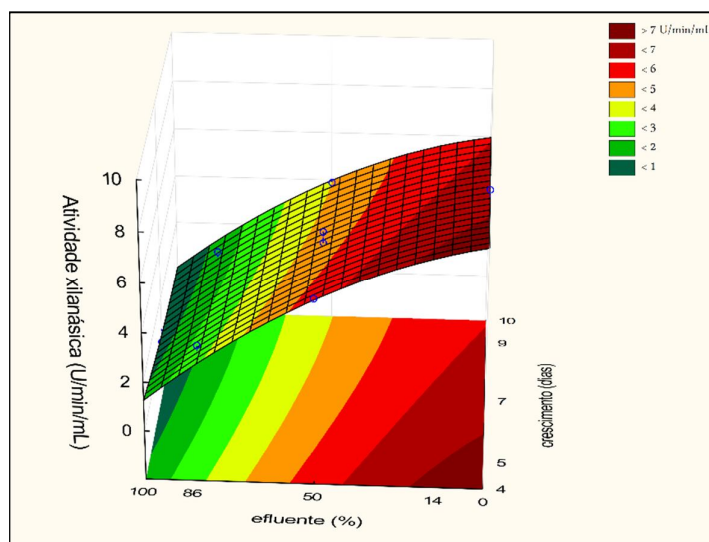


Figura 10 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade xilanásica (U/min/mL) obtida com o efluente 2.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.2.2 Atividade específica

O planejamento referente a atividade específica (U/mg) desenvolvido para o efluente 2 apresentou R^2 de 0,84 (Tabela 7), sendo que a influência das variáveis analisadas foi insignificante, pois o valor de p foi $\leq 0,05$. Quando os níveis foram inferiores para as variáveis: concentração de efluente e período de produção houve maior produção de xilanase pelo fungo *A. niger*, ou seja, grandes volumes de efluentes e longos períodos de cultivo, não favoreceram a produção enzimática, conseqüentemente uma menor concentração de efluente

aumentou a produção enzimática (Figura 11). O F-calculado foi de 20,56, ou seja, 5 vezes maior que F-tabelado (4,46). Na Figura 12 pode ser observado o gráfico de superfície de resposta. A equação que descreve o modelo para este planejamento é: $z=346,26-6,18.x-136,62.x^2-30,55.y-141,97.y^2+12,61.x.y$.

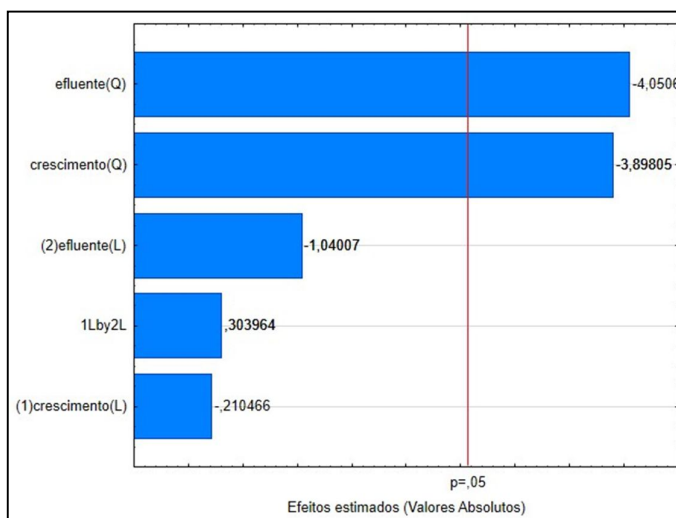


Figura 11 - Gráfico de Pareto referente a atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 2.

Fonte: Elaborado pela autora.

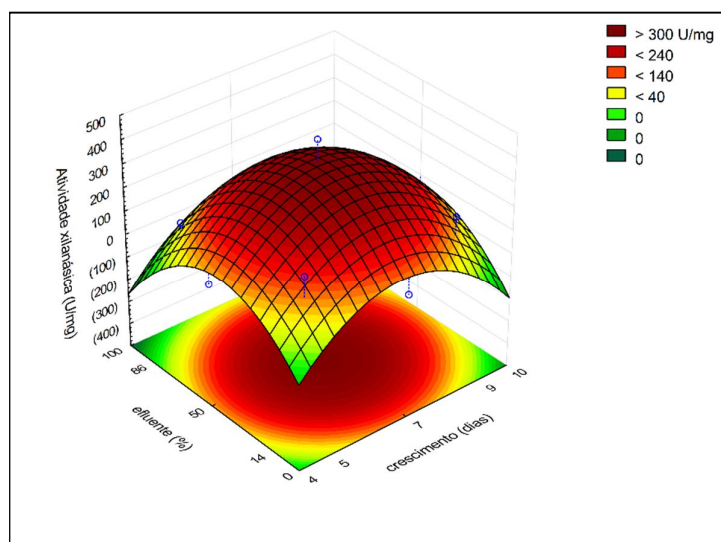


Figura 12 - Gráfico de superfície de resposta referente à atividade específica (U/mg) obtida com o efluente 2.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de planejamento fatorial observou-se que as produções de xilanase com maior atividade específica, utilizando os dois efluentes, ocorreram nas faixas de 25-50% destes em relação ao meio descrito por Nair et al. (2008) com modificações da concentração de xilana (0,5g), entre 5 a 10 dias de período de produção. Diante desse intervalo ótimo de produção os pontos centrais do planejamento, 50% da concentração de efluentes e 7 dias de período de produção, foram escolhidos para a validação das variáveis de produção.

5.3 VALIDAÇÃO

As condições ótimas obtidas através do planejamento fatorial foram fixadas como parâmetro de produção somente após a validação, evidenciando a eficácia do emprego de determinada concentração dos efluentes e período de produção. Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da produção enzimática referente a esta etapa onde utilizou-se 50% de concentração do efluente e período de incubação de 7 dias, tanto para o efluente 1 quanto para o efluente 2 e os valores preditos.

Nota-se que os valores observados na validação mostraram-se próximos ou maiores do que os valores preditos encontrados pelas equações que descrevem o modelo do planejamento fatorial.

Tabela 10 - Atividade xilanásica e atividade específica dos efluentes 1 e 2 referente a validação com parâmetros fixados pelo planejamento fatorial

Efluente	Atividade xilanásica (U/min/mL)*		Atividade específica (U/mg)*	
	Valores preditos	Valores encontrados	Valores preditos	Valores encontrados
1	5,99	6,28	39,15	38,65
2	4,52	4,29	346,26	382,15

*valores obtidos da média de duplicatas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 DETERMINAÇÃO DE PESO ÚMIDO E PESO SECO

O processo de fermentação líquida submersa empregada no cultivo enzimático de xilanase gerou biomassa fúngica e esta foi analisada quanto ao peso úmido e seco tanto nos ensaios de controles iniciais de produção como nos tratamentos do planejamento fatorial, como demonstrado nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11: Peso úmido e seco da biomassa obtida dos controles iniciais de produção.

Controle inicial de produção	Peso úmido (g)*	Peso seco (g)*
1,0g xilana	0,2	0,04
0,5g xilana	0,2	0,05
50% efluente 1	0,4	0,03
100% efluente 1	0,4	0,02
50% efluente 2	1	0,03
100% efluente 2	0,2	0,03

*valores obtidos da média de triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 12: Peso úmido e seco da biomassa obtida dos tratamentos realizados com efluente 1.

Tratamentos	Biomassa úmida (g)	Biomassa seca (g)
1	0,6	0,1
2	0,08	0,03
3	0,3	0,06
4	0,1	0,07
5	0,9	0,08
6	0,3	0,07
7	0,9	0,09
8	0,7	0,09
9	0,3	0,06
10	0,4	0,1
11	0,4	0,07

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 13: Peso úmido e seco da biomassa obtida dos tratamentos realizados com efluente 2.

Tratamento	Biomassa úmida	Biomassa seca
	(g)	(g)
1	0,5	0,09
2	1,09	0,05
3	0,7	0,05
4	0,8	0,07
5	0,3	0,07
6	0,4	0,08
7	0,5	0,08
8	0,5	0,08
9	1,2	0,08
10	0,6	0,1
11	0,3	0,08

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 14: Peso úmido e seco da biomassa obtida na validação.

Validação	Peso úmido*	Peso seco*
	(g)	(g)
Efluente 1	0,7	0,08
Efluente 2	0,5	0,08

*valores obtidos da média de duplicatas

Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

Para analisar a otimização da produção de xilanase neste estudo, após a quantificação da concentração de proteínas, determinação da atividade xilanásica e cálculos de atividade específica, utilizou-se o planejamento fatorial. Esta ferramenta permite estudar a interação de variáveis independentes e contínuas no processo de produção enzimática (ROBRIGUES e LEMMA, 2009). Bhanuet al. (2008) utilizaram o planejamento fatorial para avaliar o efeito do pH, extrato de levedura e mistura de fontes de carbono na produção de conídios por *M. anisopliae*. Patelet al. (2007) utilizaram um planejamento do tipo Plackett–Burman com oito variáveis para a produção de quitinase por *Paenibacillus sabina* JD2, permitindo a seleção prévia das variáveis relevantes. Saxena e Singh (2014) empregaram o planejamento do tipo Plackett–Burman com 10 variáveis para a produção multienzimática de amilase e protease por *Bacillus megaterium*, permitindo a seleção prévia de condições ideais. Albuquerque de Carvalho et al. (2015) utilizaram o planejamento fatorial para avaliar e investigar os efeitos linear, quadrático e de interação entre as variáveis: composição do meio de cultura, arejamento e agitação para otimização da produção de celulase por *Penicillium funiculosum*.

Visto que a ferramenta de planejamento fatorial vem sendo utilizada com eficiência, neste trabalho utilizou-se um planejamento de ordem 2ª, com pontos externos e repetições de pontos centrais para as variáveis independentes: concentração de efluentes (ácido ou alcalino) adicionados ao meio de cultura e período de produção, as quais mostraram efeito mais significativo na produção de xilanase, na presença dos dois tipos de efluentes quando os mesmos foram empregados a 50% e quando a produção foi realizada por 7 dias.

A adição dos efluentes favoreceu a produção enzimática adicionando 25mL (50%) do efluente ao meio de cultivo, o que já permite a redução de gastos com água em 50% tornando-se uma alternativa a utilização de água doce nesse setor contribuindo de maneira sustentável para a sua conservação e preservação tendo em vista que esse é um bem cada vez mais escasso (MOLDES et al., 2013; GARCIA et al., 2015).

O emprego de efluentes em bioprocessos contribui para a redução do descarte de águas residuais no ambiente levando a redução do acúmulo de compostos tóxicos. Além disso, a utilização enzimática no biobranqueamento substitui parcialmente o tratamento da polpa kraft com cloro e a enzima obtida neste estudo poderá futuramente ser empregada neste mesmo processo (BAJPAI, 2004; ADESINA e ONILUDE, 2013)

De acordo com Nair et al. (2008) a utilização pura de xilana para indução da xilanase aumenta os níveis de produção enzimática, e esse padrão é visto com o uso de vários micro-

organismos empregados para este fim, conseqüentemente os resultados obtidos pelo seu trabalho de produção de xilanase por fermentação submersa com diferentes linhagens de *Aspergillus sp.* e empregando uma concentração de 1,0 g de xilana, mostrou relativa atividade xilanásica, enquanto que no presente trabalho mesmo com a redução da concentração de xilana a metade (0,5g), visando a diminuição de custos, priorizada pelos setores industriais, apresentou atividade específica de 117,36 U/mg quando o meio de cultura se apresentava sem adição de qualquer resíduo industrial. Além disso, notou-se bons resultados mesmo quando somente os efluentes foram empregados. A produção xilanásica com a redução em 50% do valor descrito por Nair et al. (2008) para o indutor xilana, caracteriza-se um resultado promissor em ensaios de produção, pois significa redução proporcional de custos em produções enzimáticas industriais em larga escala.

Bakriet al. (2008) também empregou em seu estudo resíduos agroindustriais para produção de xilanase e a similaridade com o presente estudo é o fato de que o emprego de grande concentração dos resíduos lignocelulósicos resultou em diminuição na produção de xilanase.

Khonzueet al. (2011) otimizou a produção de xilanase empregando outra linhagem de *A. niger*, o objetivo era encontrar um meio complexo com combinações que permitissem uma melhor resposta de produção, após o emprego da metodologia de superfície de resposta a melhor produção observada apresentou atividade xilanásica de 89,5 U/min/mL em 7 dias. O ensaio realizado neste estudo constitui-se de meio de cultivo menos complexo com o acréscimo de efluentes e ainda assim houve eficiência na indução de xilanase o que caracteriza dado interessante para o setor industrial que necessita diminuir a quantidade de resíduos descartados no ambiente.

Guimarães et al. (2013) também realizou produção de xilanase empregando como resíduo farelo de trigo em cultura submersa, sabe-se que este é um resíduo muito utilizado e bem caracterizado na literatura para tal produção. Segundo os autores, o estudo apresentou bons resultados de produção, com atividade específica igual a 11 U/mg. Porém, neste trabalho de pesquisa, mesmo empregando-se efluentes não caracterizados, obteve-se resultados significantes quanto a atividade específica da xilanase obtida utilizando ambos os efluentes, por exemplo, na etapa de validação obtendo-se uma média de atividade específica igual a 38,65 U/mg para o efluente 1, e para efluente 2 a média de atividade específica igual a 382,15 U/mg. Verificou-se que o fungo *A. niger* é um bom produtor de xilanase extracelular a partir de diferentes fontes de carbono, mesmo quando essa fonte é proveniente de subprodutos. Estudos futuros utilizando subprodutos para a produção enzimática são necessários, pois estes

podem levar a descoberta da aplicabilidade de diversos resíduos e/ou efluentes como substratos de indução (OKAFOR et al., 2007).

O DCCR é uma ferramenta de delineamento que demanda poucos ensaios para ser realizado e que gera otimização do sistema em que é empregado a partir do rastreamento do ponto de resposta ótima, nessa etapa de estudo utilizou-se duas variáveis de fermentação: concentração dos efluentes e período de produção (MATEUS et al., 2001; SCHEUFELE et al., 2009). O DCCR realizado para cada um dos tipos de efluentes (Tabela 2) foi estatisticamente válido, pois o F-calculado foi maior que o F-tabelado. Os valores de R^2 obtidos no DCCR, onde R^2 é o coeficiente de explicação que fornece uma média da proporção da variação em relação à variação total das respostas, foram próximos a 1 (RODRIGUES e LEMMA, 2009). Desta forma foi possível obter os gráficos de superfície de resposta bem como as equações que descrevem o modelo para cada tratamento realizado. Para a produção enzimática com adição do efluente 1 ou 2 ambas as variáveis foram significantes. Porém, o efeito negativo é mais evidente quando se adiciona um grande volume de efluente ao meio de cultivo, e quando o mesmo é mantido por um longo período de cultivo. Lakshmi et al. (2009) mostra em seus estudos que o fator tempo de incubação possui o maior impacto sobre a produção de xilanase, e que temperatura de incubação e pH são fatores que interagem entre si.

A capacidade de produção de biomassa pelo micro-organismo empregado no processo fermentativo pode estar associada com uma maior eficiência deste (PELLIZER et al., 2007). Neste estudo observou-se essa correlação, pois os maiores pesos foram obtidos tanto em relação aos controles quanto aos tratamentos onde obteve-se maiores atividades específicas.

A maior produção de xilanase utilizando o efluente 1 e o efluente 2 ocorreram nas faixas: adição de efluente de 25-50% e período de produção entre 5 a 10 dias, com valores ótimos nos pontos centrais do planejamento, 50% de concentração dos efluentes e 7 dias de período de produção. Fica claro que a adição dos efluentes favorece a produção enzimática pelo fungo *A. niger*, e que este tem um bom crescimento, o que lhe permite uma boa produção enzimática. Esta flexibilidade nas faixas para a produção da xilanase é importante. Visto que no setor industrial os processos são diferentes e existe a necessidade de adaptação ao utilizar enzimas no processo, de acordo com a realidade a qual ela será utilizada ou produzida. O planejamento ainda permite um melhoramento da produção enzimática utilizando as equações obtidas.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a adição de ambos efluentes permitiu a produção enzimática de xilanase por *A.niger* mesmo com a redução da concentração de xilana pela metade (0,5g), entretanto grande volume de efluentes adicionados ao meio de cultivo e longos períodos de incubação não favorecem a produção. Ambos efluentes, ácido e alcalino, são capazes de induzir a produção de xilanase quando empregados, apesar de apresentarem eficiência diferente, destacando-se o efluente alcalino (2) que mostrou ser capaz de induzir xilanase com maior atividade específica.

REFERÊNCIAS

- ADESINA, F.C.; ONILUDE, A.A. Isolation, identification and screening of xylanase and glucanase producing microfungi from degrading wood in Nigeria. **Africa Journal Agricultural Research**, v. 8, n. 34, p. 4414-4421, 2013.
- AHLAWAT, S.; BATTAN, B.; DHIMAN, S.S.; SHARMA, J.; MANDHAN, R.P. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 763-770, 2007.
- ALBUQUERQUE DE CARVALHO, M.L.; CARVALHO, D.F.; BARROS GOMES, E.; NOBUYUKI MAEDA, R.; MELO SANTA ANNA, L.M.; CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. JR. Optimisation of Cellulase Production by *Penicillium funiculosum* in a Stirred Tank Bioreactor Using Multivariate Response Surface Analysis. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.
- ALENCAR GUIMARAES, N.C.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. de C.; BETINI, J.H.; ZANOELO, F.F.; MARQUES, M.R.; DE MORAES POLIZELI, M. de L.; GIANNESI, G.C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **SpringerPlus**, v. 2, p.280-380, 2013.
- AMARO-REYES, A.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; VÁZQUES-MANDUJANO, D.G. AMAYA-LLANO, S.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G.; LOERA, O.; REGALADO, C. Homologue expression of a β -xylosidase from native *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, n. 9, 2011.
- BAE, H.J.; KIM, H.J.; KIM, Y.S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3513-3519, 2008.
- BAJPAI, P. Biological Bleaching of Chemical Pulps. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 1-58, 2004.
- BAKRI, Y.; AL-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase Production by a Newly Isolated *Aspergillus niger* SS7 in Submerged Culture. **Polish Journal Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 249-251, 2008.
- BETINI, J.H.A.; MICHELIN, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Xylanase from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 819-824, 2009.
- BHANU PRAKASH, G.V.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R.R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhiziumanisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, 2008.
- BHATTACHARYA, A.S.; BHATTACHARYA, A.; PLETSCHKE, B.I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. **Biotechnology Letters**, DOI 10.1007/s10529-015-1779-3. 2015.

BISWAS, R.; SAHAI, V.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 702-708, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CHANDRA, R.; SANKHWAR, M. Influence of lignin, pentachlorophenol and heavy metal on antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from pulp paper mill effluent contaminated river water. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 6, p. 739-745, 2011.

CHEN, W.H.; LIN, B.J.; HUANG, M.Y.; CHANG, J.S.; Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 314-327, 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

DEENANATH, E.D.; IYUKE, S.; RUMBOLD, K. The Bioethanol Industry in SubSaharan Africa: History, Challenges, and Prospects. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, ID 416491, 2012.

DOBREV, G.T.; PISHTIYSKI, I.G.; STANCHEV, V.S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2671-2678, 2007.

EBRAHIMI, M. Engineering thermostable xylanase enzyme mutant from *Bacillus halodurans*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 8110-8117, 2010.

EIDA, M.F.; NAGAOKA, T.; WASAKI, J.; KOUNO, K. Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Abilities of Fungi Isolated from Coffee Residue and Saw dust Composts. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 3, p. 320-327, 2011.

ELLIS, J.T.; SIMS, R.C.; MILLER, C.D. Microbial bioproducts from cheese whey through fermentation with wastewater sludge *Clostridium* isolates. **Canadian Journal Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 431-435, 2014.

EL-TAYEB, T.S.; ABDELHAFEZ, A.A.; ALI, S.H.; RAMADAN, E.M. Effect of acid hydrolysis and fungal biotreatment on agro-industrial wastes for obtainment of free sugars for bioethanol production. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1523-1535, 2012.

FANG, H.Y.; CHANG, S.M.; HSIEH, M.C.; FANG, T.J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 36-42, 2007.

FU, G.; WANG, Y.; WANG, D.; ZHOU, C. Cloning, Expression, and Characterization of an GHF 11 Xylanase from *Aspergillus niger* XZ-3S. **Indian Journal Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 682-688, 2012.

GARCIA MILINOS, J.; VIANA, M.; BRENNAN, M.; DONOHUEL Importance of long-term cycles for predicting water level dynamics in natural lakes. **PloS One**, v. 10, n. 3, 2015.

GLITHERO, N.J.; RAMSDEN, S.J.; WILSON, P. Barriers and incentives to the production of bioethanol from cereal straw: A farm business perspective. **Energy Policy**, v. 59, n. 100, p. 161-171, 2013.

GOLUGURI, B.R.; THULLURI, C.; CHERUPAALY, M.; NIDADAVOLU, N.; ACHUTHANANDA, D.; MANGAMURI, L. N.; ADDEPALLY, U. Potential of Thermo and Alkali Stable Xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in Biobleaching of Wood Kraft Pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2369-2380, 2012.

GORDON, C.L.; KHALAJ, V.; RAM, A.F.; ARCHER, D.B.; BROOKMAN, J.L.; TRINCI, A.P.; JEENES, D.J.; DOONAN, J.H.; WELLS, B.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.; ROBSON, G.D. Glucoamylase: green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*. **Microbiology**, v. 146, p. 415-426, 2000.

GUIMARAES, A.N.C.; SORGTTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; BETINI, J.H.; ZANOELO, F.F.; MARQUES, M.R.; DE MORAES POLIZELI, M.L.; GIANNESI, G.C. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate. **Springerplus**, v. 380, n. 2, p. 1-7, 2013.

HULL, C. M.; LOVERIDGE, E. J.; DONNISON, I. S.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Co-production of bioethanol and probiotic yeast biomass from agricultural feedstock: application of the rural biorefinery concept. **AMB Express**, v. 4, DOI 10.1186/s13568-014-0064-5, 2014.

JUSTINO C.; MARQUES A. G.; RODRIGUES D.; SILVA L.; DUARTE A. C.; ROCHA-SANTOS T.; FREITAS A. C. Evaluation of tertiary treatment by fungi, enzymatic and photo-Fenton oxidation on the removal of phenols from a kraft pulp mill effluent: a comparative study. **Biodegradation**, v. 22, p. 267-274, 2011.

KAMALI, M.; KHODAPARAST, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, S0147-6513, n. 14, 2014.

KAUR, A.; MAHAJAN, R.; SINGH, A.; GARG, G.; SHARMA, J. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9150-9155, 2010.

KHONZUE, P.; LAOTHANACHAREON, T.; RATTANAPHAN, N.; TINNASULANON, P.; APAWASIN, S.; PAEMANEE, A.; RUANGLEK, V.; TANAPONGPIPAT, S.; CHAMPREDA, V.; EURWILAICHITR, L. Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 6, p. 1129-1134, 2011.

LAKSMI, G.S.; RAO, C.S.; RAO, R.S.; HOBBS, P.; PRAKASHAM, R.S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation

using palm industrial waste: A statical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51-57, 2009.

LENNARTSSON, P.R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M.J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 3-8, 2014.

LI, Y.; LIU, Z.; ZHAO, H.; XU, Y.; CUI, F. Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicilliumoxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 82-86, 2007.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento compost central. **ActaScientiarum Technology**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MERAYO, N.; HERMOSILLA, D.; BLANCO, L.; CORTIJO, L.; BLANCO, A. Assessing the application of advanced oxidation processes, and their combination with biological treatment, to effluents from pulp and paper industry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 420-427, 2013.

MOLDES A.; GONZÁLEZ, J.M.; RODRIGUES, L.R.; CONVERTI, A. New trends in biotechnological processes to increase the environmental protection. **Biomed Research**, p. 1-2, 2013.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **RPQ**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MTUI, G.Y.S. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. **Sci Res Essays**, v. 7, n. 15, p. 1544-1555, 2012.

MUÑOZ-PÁEZ, K.M.; POGGI-VARALDO, H.M.; GARCÍA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M.T.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; BARRERA-CORTÉS, J.; ROBLES-GONZÁLEZ, I.V.; RUIZ-ORDÁZ, N.; VILLA-TANACA, L.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N. Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: effect of temperature and addition of buffer. **Waste Management & Research**, v. 32, n. 5, p. 434-440, 2014.

MUTHEZHILAN, R.; ASHOK, R.; JAYALAKSHMI, S. Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicilliumoxalicum* in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, p. 020-028, 2007.

NAIR, S.G.; SINDHU, R.; SHANKAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 82-86, 2008.

NINAWA, S.; KAPOOR, M.; KUHAD, R.C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1252-1258, 2008.

OKAFOR, U.A.; OKCHI, V.I.; ONYEGEME-OKERENTA, B.M.; CHINEDU, S.N. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 14, p. 1710-1714, 2007.

OZEKI, K.; TAKAGI, Y.; ODA, S.; OHASHI, S. Production of Xylanase with a transformant of *Aspergillus oryzae* RIB40 in a Liquid-Surface Immobilization (LSI) System. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 224-226, 2010.

PATEL, B.; GOHEL, V.; RAOL, B. Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Paenibacillus sabina* strain JD2. **Annals of Microbiology**, v. 57, p. 589-597, 2007.

PELLIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology & Management Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; OLIVEIRA, F.; PÉREZ-BIBBINS, B.; BELO, I.; TORRADO AGRASAR, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Optimization of Xylanase Production by Filamentous Fungi in Solid-State Fermentation and Scale-up to Horizontal Tube Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 3, p. 803-825, 2014.

POLIZELI, M.L.; RIZZATTI, A.C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V.R.; MISHRA, R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 433-441, 2004.

RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. **Cárita Editora**, v. e, p. 358, 2009.

SAINI, R.; SAINI, J. K.; PATEL, A. K.; MATHUR, A.; TULI, D.; SINGHANIA, R.R.. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, DOI 10.1016, 2015.

SAXENA, R.; SINGH, R. Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* strain B69. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

SCHEUFELE, F.B.; JUNIOR, A.T.; PARIS, L.D.; NOVAKI, L.; HASAN, S.D.M. Avaliação e otimização de parâmetros operacionais da fermentação em estado sólido para produção de protease pelo fungo *Aspergillus niger* sp em soja bruta. **Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente**, 2009.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Determinação de alguns fatores fisiológicos que afetam a produção de xilanase de *Trichoderma reesei* 1073 D3. **New Microbiologica**, v. 26, n. 1, p. 75-81, 2003.

SHAH, A.R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1763-1771, 2005.

SHARMA, A.; KUMAR, A. Xylanases: An Overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2013.

SHARMA, A.; THAKUR, V.V.; SHRIVASTAVA, A.; JAIN, R.K.; MATHUR, R.M.; SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: An Overview. **British Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-28, 2014.

STAMATELATOU, K.; GIANTSIOU, N.; DIAMANTIS, V.; ALEXANDRIDIS, C.; ALEXANDRIDIS, A.; AIVASIDIS, A. Biogas production from cheese whey wastewater: laboratory- and full-scale studies. **Water Science Technology**, v. 69, n. 6, p. 1320-1325, 2014.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

TAN, H.T.; LEE, K.T.; MOHAMED, A.R. Second-generation bio-ethanol (SGB) from Malaysian palm empty fruit bunch: Energy and exergy analyses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5719-5727, 2010.

VENTORINO, V.; ALIBERTI, A.; FARACO, V.; ROBERTIELLO, A.; GIACOBBE, S.; ERCOLINI, D.; AMORE, A.; FAGNANO, M.; PEPE, O. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. **Scientific Reports**, v. 2, n. 5, p. 8161, 2015.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Production of cellulase-Free Xylanase by the Recombinant *Bacillus subtilis* and its Applicability in Paper Pulp Bleaching. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1441-1447, 2013.

VERMA, Y. Toxicity assessment of dye containing industrial effluents by acute toxicity test using *Daphnia magna*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 1, p. 41-49, 2011.

WEERACHAVANGKUL, C.; LAOTHANACHAREON, T.; BOONYAPAKRON, K.; WONGWILAIWALIN, S.; NIMCHUA, T.; EURWILAICHITR, L.; POOTANAKIT, K.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA, V. Alkaliphilic Endoxylanase from Lignocellulolytic Microbial Consortium Metagenome for Biobleaching of Eucalyptus Pulp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1636-1643, 2012.

WU, T.Y.; MOHAMMAD, A.W.; JAHIM, J.M.; ANUAR, N. A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 40-52, 2009.