

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

155 826 000
200327551

**FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE XILANASE
EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS**

Autora: Luciana Alves de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Co-orientador: Prof. Dr. Benício Barros Neto

Tese de Doutorado a apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho - 2003

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	IL Unicamp
OL 4 f	
V	EX
TOMBO BCI	55420
PROC.	16.124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/08/03
Nº CPD	

CM00188452-0

Bib Id 298609

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

OL4f Oliveira, Luciana Alves de
Fermentação extrativa de xilanase em sistemas de duas
fases aquosas / Luciana Alves de Oliveira. --Campinas,
SP: [s.n.], 2003.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi; Benício Barros
Neto.

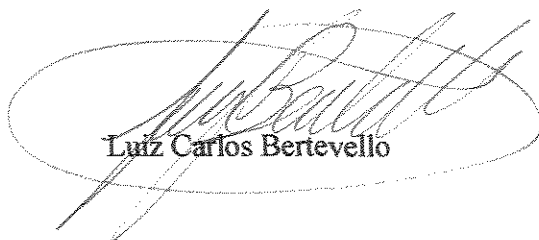
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Proteínas - Separação. 3. Proteínas
- Purificação. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Barros Neto,
Benício. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de Doutorado defendida por Luciana Alves de Oliveira , em 21 de julho de 2003 e aprovada pela banca constituída pelos doutores:



Luiz Bezerra de Carvalho Júnior



Luiz Carlos Bertevello



Ana Paula Brescancini Rabelo



Telma Teixeira Franco



Elias Basile Tambourgi

Esta versão corresponde à final da Tese de Doutorado defendida por Luciana Alves de Oliveira , em 21 de julho de 2003 .

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Tambourgi', is positioned above the printed name.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi - orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me ajudado a concluir mais esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela acolhida que proporcionou à realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Benício Barros Neto como co-orientador, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança.

À Profa. Ana Porto, pela colaboração nos trabalhos desta tese.

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho, Diretor do LIKA/UFPE, por disponibilizar as instalações da referida instituição.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Jr, chefe do setor de Bioquímica LIKA/UFPE, pela acolhida.

Às Professoras Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves, do Departamento de Bioquímica UFPE, e Maria Alice Zarur Coelho, da Universidade Federal do Rio Janeiro, pela ajuda, amizade e exemplo de profissionalismo.

À Profa. Rosa Valéria (UFPB), pela atenção e fornecimento de goma de cajueiro, muito obrigada.

À Profa. Márcia Moraes (UPE), pela grande ajuda na primeira parte desse trabalho.

Ao Prof. Mohand Benachour (UFPE), pela atenção e amizade.

À Profa. Vânia de Souza Andrade (UFAL), pelo carinho e amizade.

À Profa. Cristina Maria de Souza Motta, do Departamento de Micologia (UFPE), pela atenção e grande auxílio.

À Profa. Ana Maria Souto Maior, do Departamento de Antibióticos (UFPE), pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do LIKA, peças-chaves para o bom andamento das atividades experimentais, em especial, Carmelita, D. Celeste, Cleide, Conceição, Felipe, Ilma, Kilma, Moisés, Sr. Otaviano, Paulina e Vera.

Aos funcionários: Vivaldo Araújo da Silva e Artur Bibiano, do Departamento de Nutrição (UFPE); Marcelo Francisco Gomes, do Departamento de Mineralogia (UFPE) e Manoel Dinamerito de Oliveira Gomes, do Departamento de Engenharia Química (UFPE), pela grande ajuda na moagem dos resíduos e da goma do cajueiro.

Ao meu amor, Givanildo Bezerra de Oliveira, por todo carinho, apoio, atenção e inestimável ajuda para realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LIKA, particularmente aqueles do Laboratório de Bioquímica, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos Raquel, Jaqueline, Ian, Luciana da Matta, Roseane, Teodora, Rosangela, Noemia, Laura, Dayseane, Hercília, Lucio e Simone pela colaboração e paciência.

À Danielly Bruneska pela amizade e pela grande ajuda computacional.

À minha família pelo apoio.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro fornecido.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Nos últimos anos, os sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) têm encontrado aplicações nas diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere à utilização de sistemas alternativos e de baixo custo. Dessa forma é que o sistema constituído de polissacarídeo da goma de cajueiro e polietilenoglicol foi utilizado, no presente trabalho, para o cultivo do fungo *Penicillium janthinellum* e produção de xilanase.

Inicialmente, foram avaliados cinco resíduos agroindustriais (bagaço de cana, casca de mandioca, casca de aveia, sabugo e casca de milho) como indutores para a produção desta enzima. Estes resíduos foram hidrolisados e suas frações líquidas foram utilizadas para o cultivo. A cinética de crescimento do *P. janthinellum* foi acompanhada para todos os resíduos durante 12 dias. O sabugo de milho e a casca de aveia foram os melhores indutores da xilanase.

De posse dos melhores resíduos, procedeu-se um planejamento, no intuito de determinar as variáveis mais importantes, tanto para fermentação convencional como para a extrativa. O planejamento fracionário em dois níveis procurou avaliar a influência das seguintes variáveis: resíduo agroindustrial, tempo de cultivo, pH inicial, agitação, temperatura e composição do sistema de duas fases aquosas.

A maior produção de xilanase no meio convencional foi de 142,85 U/mL para o hidrolisado de aveia. Isto significou um aumento de 2,58 vezes em relação ao obtido anteriormente sem o estudo das variáveis. A xilanase produzida durante a fermentação extrativa no sistema PEG/polissacarídeo da goma do cajueiro concentrou-se na fase superior. O maior valor da produção de xilanase na fase superior e seu rendimento foram 160,7 U/mL e 97%, para o hidrolisado de aveia no sistema PEG 8000/ goma. Assim, o crescimento do *P. janthinellum* e a produção de xilanase no SDFA foram superiores quando comparados ao sistema convencional. A atividade máxima da enzima no SDFA foi obtida no quinto dia, enquanto que para o meio controle esta foi encontrada no sexto dia.

Palavras-chave: fermentação extrativa, sistemas de duas fases aquosas, polissacarídeo da goma do cajueiro, xilanase, *Penicillium janthinellum*, resíduo agro-industrial.

ABSTRACT

In recent years, aqueous two-phase systems (ATPS) have found applications in several biotechnology areas, specially when utilizing alternative low-cost biphasic system. Therefore, in the present work, the aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol was used for *Penicillium janthinellum* cultivation and xylanase production.

Initially five agricultural wastes (sugar cane bagasse, cassava peel, oat husk, corn cob and corn husk) were evaluated for xylanolytic enzymes production by *P. janthinellum*. These residues were hydrolyzed and their liquid fractions used for cultivation. Growth kinetic was accomplished for all residues during twelve days. Corn cob and oat husk were the best inducers of xylanase.

A factorial design was performed using corn cob and oat husk, which intended to determine the most important variables for conventional and extractive fermentation. Two-level fractional factorial design evaluated the influence of the following variables: agro-industrial residue, cultivation time, pH initial, agitation, temperature and composition of aqueous two-phase system.

The highest xylanase production was 142.85 U/mL in conventional medium of oat husk hydrolyzate. This mean an increase of 2.58 folds when compared to that obtained previously. Xylanase produced during extractive fermentation partitioned into the upper phase. The highest xylanase production in upper phase and its yield were 160.7 U/mL and 97%, respectively, using PEG 8000/gum with oat husk. *P. janthinellum* growth and enzyme production in ATPS was superior to that conventional system. Maximum xylanase activities were obtained on the 5th day for ATPS and on the 6th day for control medium.

Key-words: extractive fermentation, aqueous two-phase system, cashew-nut tree gum, xylanase, *Penicillium janthinellum*, agro-industrial residue.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA	xi
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1. REVISÃO DA LITERATURA	4
1- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	5
1.1- SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	5
1.1.1- Polímeros Formadores das Fases	7
<i>1.1.1.1- Goma do Cajueiro</i>	<i>8</i>
1.1.2- Fatores que Influenciam a Partição em SDFA	9
2- FERMENTAÇÃO EXTRATIVA	10
2.1- EFEITO DOS POLÍMEROS FORMADORES DAS FASES NO CRESCIMENTO CELULAR E NA FORMAÇÃO DO PRODUTO ...	10
2.2- FERMENTAÇÃO	12
3- XILANA	15
4- PRODUÇÃO DE XILANASES	17

4.1 - FATORES QUE AFETAM O RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE XILANASE	18
4.2 - POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS DAS XILANASES	19
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
Capítulo 2. Influence of agricultural wastes on xylanase production by <i>Penicillium janthinellum</i>	28
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Materials and Methods	31
2.1. Microorganism	31
2.2. Preparation of agro-industrial residue acid hydrolysate	31
2.3. Cultivation medium and enzyme production	31
2.4. Enzymes assays	32
2.5. Dry biomass	32
2.6. Protein determination	32
2.7. Determination of fermentation parameters	33
3. Results and Discussion	33
4. Acknowledgements	40
5. References	40
Capítulo 3. A factorial design study of xylanase production by <i>Penicillium janthinellum</i>	44
Abstract	45
1. Introduction	46
2. Materials and Methods	47
2.1. Microorganism and growth conditions	47

2.2. Preparation of the agro-industrial residue acid hydrolysate	47
2.3. Enzyme production	47
2.4. Enzyme activity and protein determination	48
2.5. Dry biomass	48
2.6. Statistical analysis	49
3. Results and Discussion	49
3.1. 2 ⁵ Experimental design to xylanase production and cellular growth	49
4. Acknowledgements	57
5. References	57
 Capítulo 4. Xylanase production by <i>Penicillium janthinellum</i> in aqueous two-phase systems	 61
Abstract	62
1. Introduction	63
2. Materials and Methods	64
2.1. Polymers	64
2.2. Microorganism	64
2.3. Preparation of agro-industrial residue acid hydrolysate	64
2.4. Growth conditions and enzyme production	65
2.5. Enzyme activity and protein determination	66
2.6. Microbial growth	66
3. Results and discussion	66
4. Acknowledgements	73
References	74
 CONCLUSÕES	 77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Diagrama de fases esquemático de um sistema de duas fases aquosas .	6
FIGURA 02- Uma estrutura hipotética de xilana de planta mostrando os diferentes grupos substituintes com os sítios de ataque pelas xilanases microbianas. Sendo: Ac- grupo acetato, R= H- ácido p-cumárico, R= OCH ₃ - ácido ferúlico (BEG <i>et al.</i> , 2001)	16
Fig.1 - Time course of growth and enzyme production by <i>P. janthinellum</i> in A- Cassava peel, B- corn cob, C- corn husk, D- oat husk and E- sugar cane Bagasse hydrolysates. Growth was monitored by dry mycelial weight and enzyme activity was assayed from cell free culture supernatant. Xylanase (■), biomass (●), protein content (Δ), acid protease (▲), alkaline protease (□), reducing sugars (O) and pH (▼). Fungi were grown at 30°C and 60 rpm	34
Fig. 1- Pareto chart of effects for the 2 ⁵ experimental design for xylanase activity. The vertical line marks the 95% significance limit	50
Fig. 2- Pareto chart of effects for the 2 ⁵ experimental design for biomass production	52
Fig. 3- Plot biomass versus xylanase activity. Full circles indicate the best assays ...	53
Fig. 4- Production of xylanase using 40 rpm with residue hydrolysate pH 4.5 (A) and 6.5 (B) or 80 rpm with residue hydrolysate pH 4.5 (C) and 6.5 (D). Xylanase (□), biomass (O) and reducing sugar (Δ) are plotted as filled symbols (oat husk) or empty symbols (corn husk)	55
Fig. 1- Pareto chart of effects for xylanase production by <i>P. janthinellum</i>	69
Fig. 2- Partition coefficient versus xylanase activity in upper phase. Full circles indicate the best assays	69
Fig. 3- Time course of <i>P. janthinellum</i> cultivation in ATPS and reference system. (a) biomass, (b) xylanase and (c) specific xylanase activity. Fermentation was carried out at 40 rpm, 25°C and pH 6.5, using corn cob (filled symbol) and oat husk (empty symbol). Conventional fermentation (O), PEG 4000/gum (□) and PEG 8000/gum (Δ). Each experiment was repeated two times	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- Fermentação extrativa de enzimas em sistemas de suas fases aquosas	13
TABELA 02- Fermentação extrativa de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas	14
Table 1 - Agro-wastes lignocellulose compositions	36
Table 2 - Kinetic parameters of <i>Penicillium janthinellum</i> growth and agro-industrial residues costs	38
Table 3 – Xylanase production by different <i>Penicillium</i> species in submerged cultivations	39
Table 1- Levels of independent variables in the 2^5 factorial design	48
Table 2- 2^5 factorial design and results obtained	51
Table 1- Levels of independent variables in the 2^{6-1} factorial design	65
Table 2- Results of the 2^{6-1} factorial designs	68
Table 3. Production of xylanase by <i>P. janthinellum</i> at 25°C and 40 rpm in aqueous two- phase systems PEG/gum and conventional medium	72

NOMENCLATURA

$\mu_{\text{máx}}$ - maximum specific growth rate

ATPS - aqueous two-phase system

HEC - hidroxietilcelulose

K - coeficiente de partição / partition coefficient

PEG - polietilenoglicol

PEI - polietilenimina

PVA - álcool polivinílico

Q_p - volumetric rate of xylanase production

SDFA - sistemas de duas fases aquosas

V_r - volume ratio between top and bottom phases

Y - percentage yield of the enzyme in the top phase

INTRODUÇÃO

Técnicas de recuperação de biomoléculas, baseadas na partição líquido-líquido, têm sido desenvolvidas. Contudo, o uso de uma fase orgânica tem encontrado aplicação limitada no processamento de produtos sensíveis como proteínas e células, devido a baixa solubilidade e desnaturação das biomoléculas em solventes orgânicos. Os sistemas de duas fases aquosas são biocompatíveis com as células e preservam a função biológica das proteínas com acentuada estabilidade (ALBERTSSON, 1986). Para a formação de sistemas de duas fases aquosas (SDFA), a dextrana fracionada e o polietilenoglicol (PEG), são os 2 polímeros mais amplamente utilizados, devido às suas características químicas e físicas bem conhecidas. Apesar do sistema PEG/dextrana ser clássico, a dextrana é extremamente dispendiosa para ser utilizada industrialmente, devido ao seu elevado custo de purificação (CHRISTIAN *et al.*, 1998). Uma ampla variedade de polímeros tem sido testada para a obtenção de sistemas de duas fases aquosas. Para o campo da pesquisa, a maioria dos sistemas é útil, mas quando são extrapolados para escala industrial, outros critérios devem ser avaliados. O custo do polímero, o tempo de separação das fases, a quantidade de polímero necessária para formação do sistema de duas fases, e a possibilidade da reutilização do polímero, são fatores de grande importância (COSTA *et al.*, 2000).

O cajueiro é uma planta nativa do nosso país e somos um dos maiores produtores mundiais de castanha de caju. O principal produto da cajucultura é a utilização da castanha para produção de amêndoa. No entanto, outros derivados como a goma, o pedúnculo e o líquido da castanha de caju têm um baixo aproveitamento. A goma de cajueiro é extraída do caule da planta e sua extração não traz prejuízo à produção de frutos e não requer grandes investimentos, podendo ser mais uma fonte de renda oriunda do cajueiro. Devido à grande disponibilidade de cajueiros no Brasil, seria proveitoso o estudo de aplicações para a goma que deles exsudam (PAULA & RODRIGUES, 1995). Assim um novo e promissor sistema de duas fases aquosas, composto por polietilenoglicol e polissacarídeo da goma de cajueiro, tem sido caracterizado (OLIVEIRA *et al.*, 2002a,b; SARUBBO *et al.*, 2000). Este sistema apresentou baixo tempo de separação e baixo custo dos polímeros formadores das fases.

A fermentação extrativa, um processo que integra produção e recuperação *in situ*, é o método de escolha para aumentar o baixo rendimento dos processos de fermentação convencionais. As fermentações extrativas utilizando sistemas de duas fases aquosas são uma alternativa promissora para os processos convencionais, desde que, elas forneçam um meio não desnaturante para as biomoléculas e estabilizem as células (SINHA *et al.*, 2000a).

Durante a última década, as aplicações das xilanases voltaram-se particularmente para a indústria de papel e celulose. No entanto, as xilanases desempenham um papel importante na extração de café, óleos vegetais, amido, flavorizantes e pigmentos; para liquefazer frutas e vegetais, na fermentação da cerveja para evitar problemas na filtração e turvação, nas indústrias de panificação e forragem, na clarificação de vinhos e sucos, e no pré-tratamento da forragem para melhorar a digestibilidade do alimento dos ruminantes e para facilitar a compostagem. As xilanases em sinergismo com várias outras enzimas, tais como mananases, ligninases, xilosidases, glucanases, glucosidases, podem ser utilizadas para a geração de combustíveis biológicos, tal como etanol e xilitol, a partir de biomassas lignocelulósicas (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

As xilanases microbianas são geralmente obtidas a partir de meios complexos e encontram-se diluídas. O somatório das várias etapas necessárias aos processos de purificação de enzimas alcança de 50 a 90% do custo total do produto (DIAMOND & HSU, 1992). Assim, devido à importância que as xilanases vêm adquirindo, torna-se fundamental o desenvolvimento de bioprocessos que viabilizem sua produção e purificação. Para tal, faz-se necessário que se encontre uma combinação ótima entre microrganismo, processo fermentativo e métodos de recuperação de tais enzimas. O uso de resíduos agrícolas, abundantemente disponíveis e de custos apropriados, que resultem em rendimentos elevados na produção de xilanase, aliados a métodos de purificação adequados, que forneçam procedimentos rápidos e simples, poderá reduzir o custo da enzima e assim facilitar sua utilização na indústria.

Neste contexto, o fungo *Penicillium janthinellum* foi cultivado no sistema de duas fases aquosas, polietilenoglicol e polissacarídeo da goma de cajueiro, utilizando hidrolisados de resíduos agroindustriais como indutores. E este procedimento foi proposto para fermentação extrativa desta xilanase.

Dessa forma, esse trabalho foi constituído das seguintes etapas:

- Investigação da produção de xilanase pelo *P. janthinellum*, utilizando-se cinco resíduos agroindústrias hidrolisados (bagaço de cana, sabugo de milho, casca de grão de milho, casca de mandioca e casca de aveia).
- Determinação das variáveis mais importantes para a produção de xilanase pelo *P. janthinellum* nos resíduos selecionados como melhores indutores.
- Realização de fermentação extrativa desta xilanase no sistema de duas fases aquosas, composto de polietilenoglicol e polissacarídeo da goma do cajueiro. Bem como, determinação das variáveis mais importantes para a produção desta enzima neste sistema extrativo.

Assim, o presente trabalho encontra-se dividido em capítulos, os quais apresentam as diferentes etapas desenvolvidas. Inicialmente encontra-se uma revisão da literatura e ao final é dada uma conclusão geral. Os capítulos redigidos na forma de artigos encontram-se em inglês.

Capítulo 1

Este capítulo apresenta uma revisão geral da literatura, a qual serviu de subsídio para análise e posterior discussão dos resultados apresentados nos demais capítulos. Nele é possível encontrar vários tópicos, que vão desde a importância dos sistemas líquido-líquido na purificação de biomoléculas, seu uso como fase para condução da fermentação extrativa, até a produção de xilanases e suas aplicações.

1- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido é um procedimento bem estabelecido em processos químicos industriais, incluindo algumas aplicações nas indústrias de fermentação tradicional, como por exemplo, as de antibióticos (DIAMOND & HSU, 1992). Entretanto, o uso de uma fase orgânica tem encontrado uma aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis, como proteínas, ácidos nucleicos e células, devido as suas baixas solubilidades em solventes orgânicos e aos efeitos desnaturantes destes. A separação de fases também pode ocorrer quando polímeros são adicionados em uma solução aquosa, como um resultado da incompatibilidade entre os mesmos. Quando as concentrações dos polímeros excedem um certo valor, duas fases aquosas são formadas, as quais são biocompatíveis com as células e preservam a função biológica das proteínas e dos ácidos nucleicos (ALBERTSSON, 1986).

1.1- SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Um sistema de duas fases aquosas (SDFA) é formado pela incompatibilidade mútua de 2 polímeros ou um polímero e um sal em solução aquosa (SILVA & FRANCO, 2000). O diagrama de fases fornece a composição exata das fases superior e inferior (FIGURA 01). A linha curva que separa a região monofásica do sistema de duas fases é chamada de binodal. As composições representadas pelos pontos abaixo da curva binodal são homogêneas e as duas fases são formadas somente pelas composições acima da curva. A linha que une os pontos que representam as composições das fases superior e inferior no diagrama de fases é denominada linha de amarração. Qualquer ponto na mesma linha de amarração terá a mesma composição das fases, mas a relação de volumes das fases será diferente. Na linha de amarração SMI (FIGURA 01), o ponto M representa a composição do sistema. Os pontos S e I são as composições das fases superior e inferior do sistema de duas fases aquosas, respectivamente. O ponto C no diagrama representa o ponto crítico, que é o ponto em que a composição e volume das fases teoricamente tornam-se iguais. A composição do sistema de duas fases aquosas depende: da massa molar e concentração dos polímeros, pH, temperatura e sais dissolvidos.

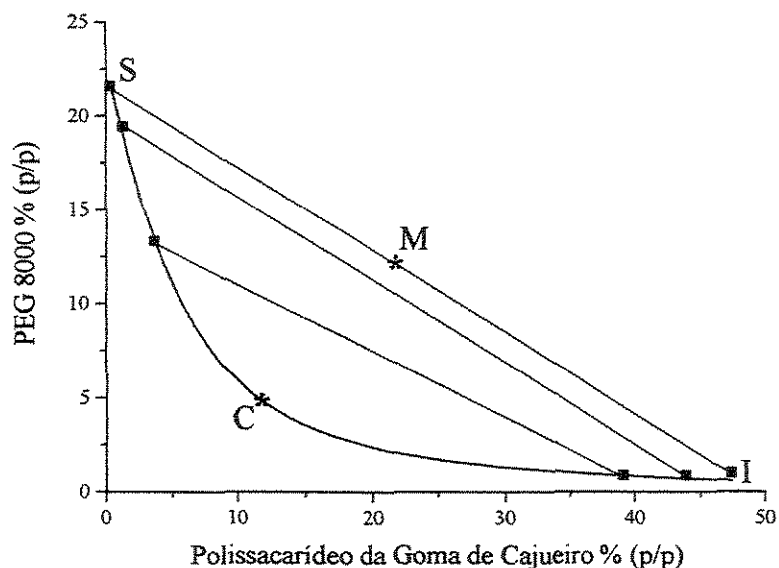


FIGURA 01- Diagrama de fases esquemático de um sistema de duas fases aquosas

De acordo com ALBERTSSON (1986), os sistemas de duas fases aquosas têm uma característica particular, por serem constituídos de aproximadamente 85-99% (p/p) de água, que combinada com a baixa tensão interfacial do sistema permite a partição de biomoléculas em condições não desnaturantes. Suas propriedades podem ser alteradas por manipulação da concentração e composição dos polímeros e sais, de modo que a partição de moléculas e partículas biológicas possa ser explorada para a obtenção de separações que de outro modo seriam dificilmente realizadas.

Para ALBERTSSON (1986) as principais vantagens da aplicação dos sistemas de duas fases aquosas são:

- facilidade no aumento de escala;
- rápida transferência de massa;
- equilíbrio alcançado a baixas energias na forma de mistura mecânica;
- possibilidade de operação em contínuo;
- estabilização das enzimas pelos polímeros;
- possibilidade de operação à temperatura ambiente, sendo
- mais econômico que outros processos de separação.

1.1.1- Polímeros Formadores das Fases

Uma ampla variedade de polímeros é usada para a obtenção de sistemas de duas fases aquosas. Para o campo acadêmico, a maioria dos sistemas são aceitos, mas quando são extrapolados para escala industrial, outros critérios devem ser avaliados. O custo do polímero, o tempo de separação das fases, a quantidade de polímeros necessária para formação do sistema de duas fases e a possibilidade da reutilização do polímero, são fatores de grande importância (COSTA *et al.*, 2000).

A dextrana de elevada massa molar e o polietilenoglicol (PEG) são os 2 polímeros que têm sido mais largamente utilizados devido as suas características químicas e físicas bem conhecidas. Apesar do sistema PEG/dextrana ser clássico, a dextrana é extremamente dispendiosa para ser utilizada industrialmente, devido ao seu elevado custo de purificação (CHRISTIAN *et al.*, 1998), exceto para alguns casos raros, quando se produzem compostos de alto valor agregado. Assim, como alternativa tem sido proposto o uso da dextrana não fracionada. Este recurso procura manter as propriedades de partição do sistema e ainda reduzir substancialmente o custo associado a aplicação em grande escala. No entanto, estes sistemas possuem alta viscosidade e conseqüentemente uma separação lenta (KRONER *et al.*, 1982). A maioria das purificações industriais em SDFA utiliza o sistema PEG/sal. Os sistemas PEG/sal possuem a vantagem dos componentes serem relativamente baratos, porém, devido a sua elevada força iônica, há a possibilidade de desnaturação de biomoléculas (CHRISTIAN *et al.*, 1998).

Diferentes polímeros, tais como derivados de amido (VENÂNCIO *et al.*, 1993; STURESSON *et al.*, 1990), álcool polivinílico (TJERNELD & JOHANSSON, 1990), maltodextrina (SZLAG & GIULIANO, 1988), derivados de celulose (SKUSE *et al.*, 1992), derivados de goma guar (VENÂNCIO *et al.*, 1995), arabinogalactana (CHRISTIAN *et al.*, 1998) e polissacarídeo da goma do cajueiro (OLIVEIRA *et al.*, 2002a,b; SARUBBO *et al.*, 2000), têm sido propostos como alternativas a dextrana fracionada.

1.1.1.1- Goma do Cajueiro

As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudados de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbiológica. As modificadas são derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por exemplo, a celulose (RODRIGUES *et al.*, 1993).

Por exsudação natural ou através de incisões, aparece no tronco e ramos do cajueiro uma goma ou resina de coloração amarelada, solúvel em água, a qual apresenta grande potencial de industrialização. Possui característica semelhante à goma arábica, podendo substituí-la como cola líquida para papel, na indústria farmacêutica, em cosméticos e como aglutinante de cápsulas e comprimidos, e na indústria de alimentos, como estabilizante de sucos, cerveja e sorvetes (PAULA & RODRIGUES, 1995).

O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., pertencente à família *Anacardiaceae*, é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado, contendo principalmente unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose (arabinogalactana ácida). Entretanto, tem sido verificado que a porcentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica (RODRIGUES *et al.*, 1993). O valor da massa molar média do polissacarídeo da goma do cajueiro relatada na literatura tem variado entre $1,1 \times 10^4$ a $6,5 \times 10^4$ (PAULA & RODRIGUES, 1995; COSTA *et al.*, 1996; MOTHE & RAO, 1999; MENESTRINA *et al.*, 1998). O cajueiro produz 178 – 2000 g/ano de goma, com um valor médio de 700 g /ano. A produção de castanha em árvores mais velhas do que 25 anos aumenta com a extração de goma (RODRIGUES *et al.*, 1993). A goma extraída do caule de cajueiros pode ser uma fonte alternativa de exploração sem grandes investimentos e durante o período em que o cajueiro não gera seus produtos principais. São apenas três meses de colheita e no resto do ano o produtor tem que se dedicar a outras atividades. Assim a goma do cajueiro é uma alternativa para o aproveitamento dos cajueiros improdutivos, em fase de declínio e senescência (PAULA & RODRIGUES, 1995).

1.1.2- Fatores que Influenciam a Partição em SDFA

A distribuição das moléculas entre as fases do SDFA é caracterizada pelo coeficiente de partição, K , que é definido como a relação da concentração do soluto na fase superior (C_S) pela fase inferior (C_I):

$$K = \frac{C_S}{C_I}$$

K é uma função das propriedades das fases, da substância a ser particionada e da temperatura. O coeficiente de partição é independente da concentração inicial do soluto e da relação de volume das fases (SILVA & FRANCO, 2000).

ALBERTSSON (1986) propôs a seguinte relação para o coeficiente de participação para moléculas complexas tais como proteínas:

$$\ln K = \ln K^\circ + \ln K_{\text{elec}} + \ln K_{\text{hidrof}} + \ln K_{\text{bioespec}} + \ln K_{\text{MM}} + \ln K_{\text{conf}}$$

onde: elec (eletroquímica), hidrof (hidrofóbica), bioespec (bioespecífica), MM (massa molar), conf (conformacional), são as contribuições das propriedades estruturais e ambientais do sistema para o coeficiente de partição e $\ln$ de K° inclui outros fatores. Portanto, o coeficiente de partição da proteína pode também ser expresso como:

$$\ln K = \ln K_{\text{ambiente}} + \ln K_{\text{estrutura}}$$

As condições ambientais que influenciam a partição das proteínas incluem: 1) tipo e concentração de sal, 2) pH, 3) massa molar, concentração e tipo do polímero formador da fase, 4) a presença de polímeros modificados com grupos carregados, hidrofóbicos ou ligantes de afinidade e 5) temperatura. As propriedades estruturais da proteína incluem sua massa molar (tamanho), estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, carga líquida, hidrofobicidade e outras propriedades de superfície (DIAMOND & HSU, 1992).

Devido a capacidade da interface de um sistema de duas fases adsorver materiais biológicos, ela pode desempenhar um papel importante na partição entre as duas fases do sistema. No estudo da partição de partículas em suspensão, como células e organelas celulares, tem que ser consideradas três regiões de partição: a fase superior, a interface e a

fase inferior. Pois a interface adsorve quantidades significativas do biomaterial. O mesmo, normalmente, não ocorre para a partição de substâncias solúveis (ALBERTSSON, 1986).

Assim, a partição depende de muitos fatores. Isto é esperado desde que as interações entre a substância particionada e os componentes de cada fase é um fenômeno complexo, envolvendo pontes de hidrogênio, interação de carga, força de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéreos. Deste modo, a partição depende da massa molar e propriedades químicas das moléculas particionadas. Para partículas, a partição é principalmente em função dos grupos de superfície que ficam em contato com os componentes das fases. Qualquer molécula acumular-se-á na fase onde o número máximo de interações é possível e um conteúdo mínimo de energia do sistema é alcançado (KULA *et al.*, 1982).

2- FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Em uma fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem se concentrar de preferência em uma das fases, enquanto que a biomolécula (produto) deve concentrar-se na fase oposta. Tal situação facilitaria a remoção do produto do seu local de produção logo que este fosse formado, assim eliminando a influência de inibição pelo produto, bem como realizando a purificação primária. Além disso, os problemas de degradação e reutilização de certos metabólitos podem ser evitados, pela partição para outra após sua formação (SINHA *et al.*, 2000a).

2.1- EFEITO DOS POLÍMEROS FORMADORES DAS FASES NO CRESCIMENTO CELULAR E NA FORMAÇÃO DO PRODUTO

O melhoramento da produção de certos biocatalisadores e outros metabólitos em SDFA ainda não é bem entendido. Entretanto, estudos da formação do produto e crescimento celular na presença dos polímeros formadores das fases têm fornecido uma idéia do mecanismo da fermentação extrativa em SDFA.

A produção de β -glucosidase com *Aspergillus phoenicis* foi estudada em dois diferentes sistemas: PEG 1550/dextrana e PEG 8000/álcool polivinílico (PVA) (PERSSON *et al.*, 1989). A produção da enzima foi 1,3 vezes superior no sistema PEG 1550/dextrana em comparação com o sistema de referência, livre de polímeros. Os autores acreditam que este aumento foi devido ao PEG, que possui uma estrutura semelhante ao Tween, já que o Tween aumenta a produção de β -glucosidase por *Aspergillus phoenicis*. No sistema PEG/PVA não houve um aumento na produção da enzima, devido a uma possível inibição do PVA sobre a produção de β -glucosidase (PERSSON *et al.*, 1989). SINHA *et al.* (2000b) estudaram o efeito dos polímeros formadores das fases e dos sistemas PEG/dextrana na produção de endoglucanase e no crescimento do fungo *Trichoderma reesei*. A produção da enzima foi maior no meio contendo PEG 6000, provavelmente porque as moléculas de PEG atuaram como surfactante. Entretanto, a produção de endoglucanase e biomassa no meio contendo PEG 4000 foi menor comparado com a fermentação controle. A inibição do crescimento celular e produção da enzima pode ter sido devido a toxicidade de moléculas de PEG de baixa massa molar. Apesar da dextrana não ser tóxica e possuir um efeito estabilizante sobre as células microbianas, o crescimento do fungo e a produção da enzima foram menores nesse polímero, provavelmente devido ao efeito da viscosidade do meio na transferência de oxigênio (SINHA *et al.*, 2000b). Outros autores também têm relatado observações similares (VAN DER POL *et al.*, 1995). CHEN e LEE (1995) estudaram a produção de quitinase em sistema PEG 20000/dextrana por *Serratia marcescens*, bem como nos polímeros formadores das fases. Quando comparada ao sistema de referência, a concentração celular aumentou muito pouco no PEG; enquanto ocorreu um aumento de 2,2 e 2,7 vezes no meio contendo dextrana e no SDFA, respectivamente. O aumento na produção no SDFA pode ter ocorrido devido ao efeito do PEG na permeabilidade da parede celular.

Pouquíssimas fermentações têm sido realizadas com sucesso em sistemas PEG/sal, nos quais a alta concentração de sal não inibiu as células microbianas. Um exemplo foi a produção de subtilina pelo *Bacillus subtilis* no sistema PEG/fosfato. Neste sistema, o PEG 6000 não demonstrou um efeito inibitório significativo, ao contrário do PEG 600, 1540 e 4000, os quais inibiram a produção de subtilina (KUBOI *et al.*, 1994). Os polietilenoglicóis de baixa massa molar, tal como 400, 1540 e 4000 têm inibido o crescimento celular de

diferentes microrganismos, possivelmente devido às suas interações com a parede celular dos microrganismos (SINHA *et al.*, 2000a).

Um sistema composto de um polieletrólito, polietilenimina (PEI), e um polímero neutro, hidroxietilcelulose (HEC), foi utilizado para fermentação extrativa de ácido láctico. Como a polietilenimina é carregada positivamente, ela pode formar um par iônico com o lactato produzido durante a fermentação, assim o lactato concentra-se preferencialmente na fase rica em PEI. Apesar do cultivo do *Lactobacillus lactis* não ser afetado pela fase superior rica em HEC, ocorreu um aumento no período da fase estacionária, provavelmente devido a influência da PEI, que pode adsorver na superfície celular. Observações microscópicas revelaram que as células de *Lactobacillus* cultivadas neste SDFA formaram grandes agregados, enquanto na ausência deste sistema, observou-se apenas pequenas cadeias (KWON *et al.*, 1996). Portanto, os polímeros devem ser avaliados em relação ao seu efeito sobre o crescimento e interação com a parede celular dos microrganismos, bem como, para um maior coeficiente de partição da biomolécula alvo (SINHA *et al.*, 2000a).

2.2- FERMENTAÇÃO

Fermentações em batelada, semicontínuas ou contínuas têm sido realizadas em SDFA. O objetivo é eliminar o efeito de inibição pelo produto ou substrato ou obter um biocatalizador com elevada atividade específica, de preferência em uma corrente livre de células. No SDFA, a partição do produto em outra fase em relação à do local de produção, tão logo este seja formado, reduz o efeito inibitório do produto na fermentação (SINHA *et al.*, 2000a). Pelo processo de fermentação extrativa têm-se produzido principalmente enzimas, como mostrado na TABELA 01 e outras substâncias como: antibióticos, solventes, surfactantes e anticorpos como sumarizado na TABELA 02. Os SDFAs têm sido utilizados para produção *in situ* e recuperação de várias enzimas em uma corrente livre de células, o que pode proporcionar o uso direto do biocatalisador. Por este processo, as enzimas são mantidas na sua forma nativa no meio não desnaturante do sistema de duas fases (SINHA *et al.*, 2000a).

TABELA 01- Fermentação extrativa de enzimas em sistemas de suas fases aquosas

Produto	Microrganismo/ célula vegetal	Sistema	K _P	K _C	Referência
Protease alcalina	<i>Bacillus</i>	PEG 4000/fosfato	1,10	I, Int	HOTH & BANIK, 1997
	<i>thuringiensis</i>	PEG 6000/fosfato	1,09		
		PEG 9000/fosfato	1,21		
	<i>B. licheniformis</i>	PEG 6000/dextrana	1,2	I, Int	LEE & CHANG, 1990
α -amilase	<i>B.</i>	PEG 3350/dextrana	0,62	I	ANDERSSON & HAHN- HÄGERDAL, 1988
	<i>amyloliquefaciens</i>				
	<i>B. subtilis</i>	PEG 6000/dextrana	1,25	I	STREDANSKY <i>et al.</i> , 1993
	<i>B. licheniformis</i>	PEG 6000/dextrana	1,25	I	
Amiloglicosidase	<i>Aspergillus niger</i>	PEG 6000/fosfato	< 1	I	RAMADAS <i>et al.</i> , 1996
Endo-Pectinase	<i>Polyporus</i>	PEG 4000/dextrana	4,70	I	ANTOV <i>et al.</i> , 2001
Exo-Pectinase	<i>squamosus</i>	bruta	2,78		
Enzima celulolítica	<i>Trichoderma</i>	PEG 8000/HPA	-	I	PERSSON <i>et al.</i> , 1991a
	<i>reesei</i>	PEG 8000/dextrana	1,41	I	
Quitinase	<i>Serratia</i>	PEG 20000 /	0,92	S	CHEN & LEE, 1995
	<i>marcescens</i>	dextrana			
Endoglucanase	<i>T. reesei</i>	PEG 6000/dextrana	2,49	I	SINHA <i>et al.</i> , 2000b
β -galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	PEG 6000/fosfato	10,3	I	KUBOI <i>et al.</i> , 1995
β -glucosidase	<i>A. phoenicis</i>	PEG 1550/dextrana	1,8	I	PERSSON <i>et al.</i> , 1989
		PEG 8000/PVA	10	I	
Fosfomonoesterases	<i>Nicotiana tabacum</i>	PEG 20000/dextrana			ILIEVA <i>et al.</i> , 1996
Ácida			0,04	I	
Alcalina			0,09	I	
Xilanase	<i>Escherichia coli</i>	PEG 6000/fosfato	3,6	I	KULKARNI <i>et al.</i> , 1999a
	recombinante				

Onde: PEG- polietilenoglicol, PVA- álcool polivinílico, HPA- hidroxipropil amido, K_P- partição da enzima, K_C- partição das células, S- fase superior, I- fase inferior, Int- interfase.

TABELA 02- Fermentação extrativa de outras biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas

Produto	Microrganismo/ célula animal	Sistema	K _P	K _C	Referência
Butanol	<i>Clostridium acetobutylium</i>	PEG 8000/dextrana	1,3	I	KIM <i>et al.</i> , 1992
Ácido láctico	<i>Lactobacillus lactis</i>	PEI/HEC	1,1	I	KWON <i>et al.</i> , 1996
	<i>Lactobacillus lactis</i>	EO-PO/HPA	-	I, S	PLANAS <i>et al.</i> , 1996
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	PEG 20000/sulfato	>1	I	LI <i>et al.</i> , 2000
Subtilina	<i>Bacillus subtilis</i>	PEG 6000/fosfato	10	I	KUBOI <i>et al.</i> , 1994
Biosurfactante	<i>Bacillus subtilis</i>	PEG 8000/dextrana	1,8	I	DROUIN & COOPER, 1992
Anticorpo monoclonal	Células de hibridoma de rato	PEG 35000/dextrana (ligante)	20	I	ZIJLSTRA <i>et al.</i> , 1996
Proteínas de choque térmico:	<i>Escherichia coli</i> recombinante	PEG 4000/dextrana			UMAKOSHI <i>et al.</i> , 1996
GroEL			8	I	
GroES			1.1		
Aromatizante	<i>Trichoderma harzianum</i>	PEG 8000/sulfato	>1	I	RITO-PALOMARES <i>et al.</i> , 2001

Onde: PEG- polietilenoglicol, PEI- polietilenimina, HEC- hidroxietil celulose, EO-PO- óxido de etileno/óxido de propileno, HPA- hidroxipropil amido, K_P- partição da enzima, K_C- partição das células, S- fase superior, I-fase inferior.

A partição de biomoléculas no SDFA é muito complexa e depende de vários fatores como mencionado anteriormente. Durante o cultivo de um microrganismo, a acumulação deste, os componentes do meio, as mudanças de pH e dos vários metabólitos produzidos, podem afetar a partição da molécula de interesse. Ainda, utilizando-se os SDFAs pode-se realizar um esquema de purificação integrada onde a fase contendo a proteína de interesse é recirculada. Por exemplo, se a enzima se concentrar na fase PEG,

por adição de uma solução concentrada de sal a fase PEG, um sistema PEG/sal será formado. As enzimas podem ser particionadas para fase rica em sal e a fase PEG reciclada. A fase sal pode então ser dessalinizada por ultrafiltração e uma solução de enzima purificada e concentrada pode ser obtida (PERSSON *et al.*, 1991b).

3- XILANA

Schulze em 1981 foi quem primeiro introduziu o termo hemicelulose para as frações isoladas ou extraídas de materiais de plantas com álcalis diluídos. As hemiceluloses incluem xilanas, mananas, galactanas e arabinanas. A classificação dessas frações hemicelulósicas depende dos tipos e quantidades de açúcares presentes. Os principais monômeros presentes na maioria das hemiceluloses são: D-xilose, D-manose, D-galactose e L-arabinose. Em plantas, as hemiceluloses estão situadas entre a lignina e as fibras de celulose. Compatível com sua estrutura química e substituições de grupos laterais, as hemiceluloses parecem estar entremeadas, entrelaçadas e covalentemente ligadas em vários pontos com o revestimento de lignina, enquanto fornecem uma capa em torno das fibras de celulose, via pontes de hidrogênio (BEG *et al.*, 2001).

Em madeiras duras e em uma gama de resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo em xilanas. A xilana é o maior constituinte da hemicelulose e é a segunda fonte renovável mais abundante, possuindo alto potencial de degradação para formação de produtos úteis (KULKARNI *et al.*, 1999b). A xilana é um polissacarídeo complexo constituído de um esqueleto de resíduos de xilose ligados por ligações glicosídicas β -1,4 (FIGURA 02), cuja cadeia principal é composta de resíduos de β -xilopirranose. A xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum nas paredes celulares das plantas, representando em torno de 30 a 35% do peso seco total. O principal componente da xilana é a D-xilose, um açúcar de 5 carbonos que pode ser convertido em proteína unicelular e em combustíveis químicos por “fábricas químicas” economicamente viáveis, como as células microbianas. Devido à heterogeneidade e complexidade da natureza química das xilanas de plantas, sua quebra completa requer a ação de um complexo de várias enzimas hidrolíticas com especificidade e modos de ação diversos. As enzimas envolvidas na hidrólise das xilanas raramente são encontradas isoladamente, mas

estão geralmente presentes como parte de um sistema multicomponente, sendo denominadas xilanases. O sistema enzimático xilanolítico é usualmente composto de um repertório de enzimas hidrolíticas: β -1,4-endoxilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetil xilana esterase e ácido ferúlico (ácido ferúlico e p-cumárico) esterase (FIGURA 02). Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter xilana em seus açúcares constituintes. A presença de tais sistemas enzimáticos multifuncionais é muito comum entre os fungos, actinomicetos e bactérias (BEG *et al.*, 2001).

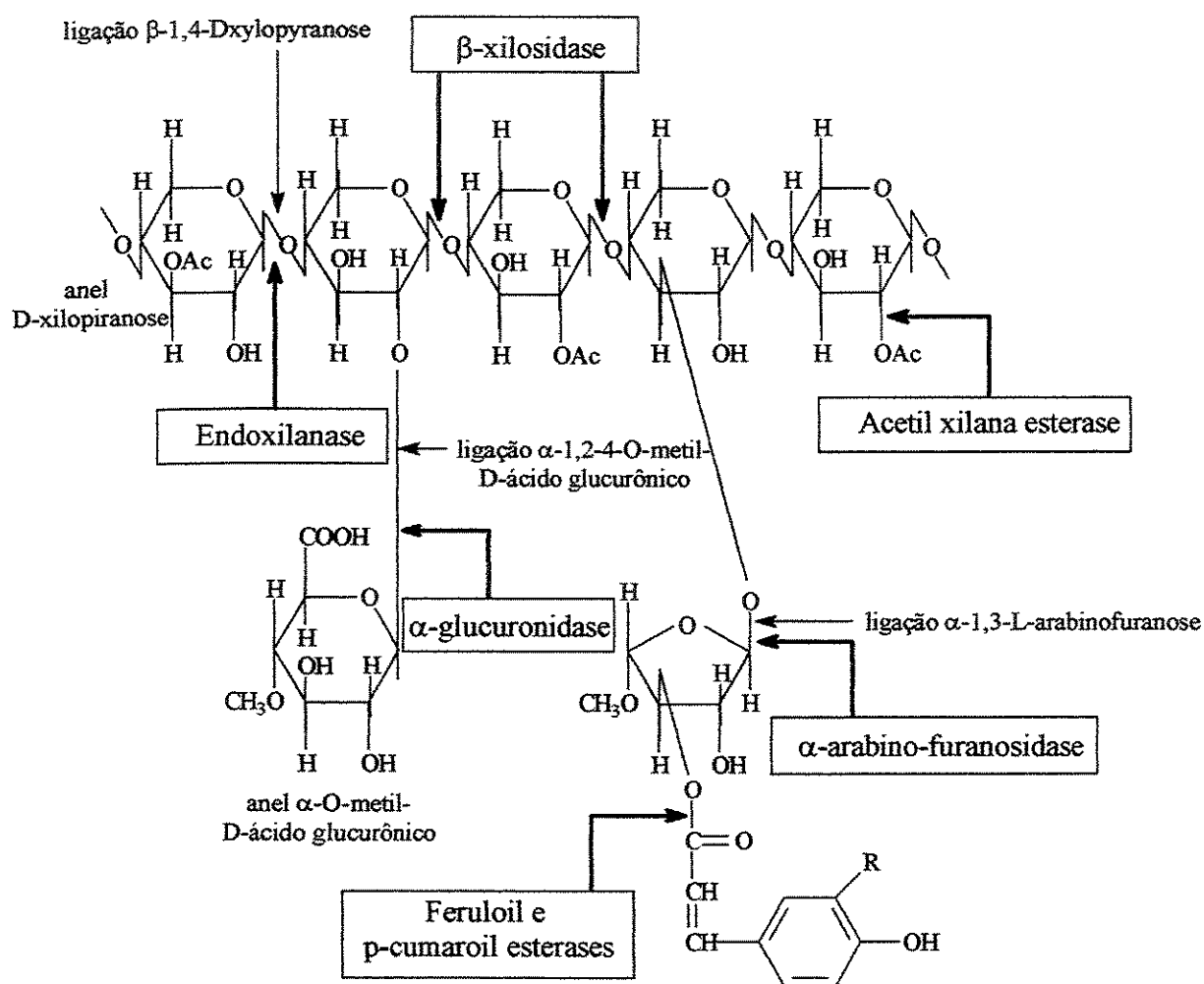


FIGURA 02- Uma estrutura hipotética de xilana de planta mostrando os diferentes grupos substituintes com os sítios de ataque pelas xilanases microbianas. Sendo: Ac- grupo acetato, R= H- ácido p-cumárico, R= OCH₃- ácido ferúlico (BEG *et al.*, 2001)

4 – PRODUÇÃO DE XILANASES

Um dos principais fatores para a eficiente produção das xilanases é a escolha de um substrato indutor apropriado. Particularmente, os fungos filamentosos são produtores interessantes das xilanases, já que eles produzem uma quantidade muito maior do que aquelas de leveduras e bactérias. Entretanto, xilanases de fungos são geralmente associadas com celulases. A produção seletiva de xilanase é possível no caso de espécies *Trichoderma* e *Aspergillus*, usando somente xilana como fonte de carbono. Em celulose, esses microrganismos produzem celulase e xilanase, que pode ser devido a traços de hemiceluloses presentes no substrato celulósico (KULKARNI *et al.*, 1999b). O *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 isolado de madeira em decomposição em Lorena/SP, foi descrito como um bom produtor de xilanase, com baixos níveis de celulase, em fermentação submersa utilizando hidrolisado de bagaço de cana (PALMA *et al.*, 1996; MILAGRES & PRADE, 1994).

Substratos hemicelulósicos de baixo custo, como sabugo de milho, talo de milho, farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de cana, farelo ou palha de arroz têm sido adequados para a produção de xilanases no caso de certos microrganismos, tais como, *Aspergillus tamarri* (KADOWAKI *et al.*, 1997), *Auerobasidium pullulans* (KARNI *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (KUHAD *et al.*, 1998), *Melanocarpus albomyces* (JAIN, 1995), *Thermomyces lanuginosus* (PUCHART *et al.*, 1999) e *Bacillus* sp (GESSESSE & MAMO, 1999), *Clostridium absonum* (RANI & NAND, 2000), *Streptomyces cuspidosporus* (MAHESWARI & CHANDRA, 2000), *Streptomyces* sp (TECHAPUN *et al.*, 2002). Actinomicetos e bactérias exibem pH ótimo para crescimento e produção da enzima próximo do neutro, em contraste ao pH ácido, geralmente requerido, para fungos. Embora numerosas espécies produtoras de xilanase tenham sido descritas, a produção comercial é praticamente restrita a *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. (TECHAPUN *et al.*, 2003, HALTRICH *et al.*, 1996). Entretanto, o cenário futuro pode ser diferente, devido as várias espécies promissoras relatadas e que produzem xilanase com alto rendimento e com maior estabilidade em condições extremas de pH e temperatura (TECHAPUN *et al.*, 2003).

4.1 - FATORES QUE AFETAM O RENDIMENTO NA PRODUÇÃO DE XILANASE

Quando a fermentação da xilanase é realizada em substratos complexos, vários fatores atuam de modo combinado ao nível da expressão enzimática. Dentre estes fatores encontram-se a acessibilidade ao substrato, a taxa e a quantidade de liberação dos xilooligossacarídeos e da xilose (KULKARNI *et al.*, 1999b). Em muitos casos, açúcares facilmente metabolizáveis, tal como glicose e/ou xilose são supressores da síntese de xilanase. Assim a regulação da secreção de xilanase pelos microrganismos ainda não é completamente entendida. Desde que a xilana não é capaz de entrar na célula microbiana, a indução de xilanase é estimulada pelos fragmentos da xilana de baixa massa molar, que são produzidos no meio pela pequena quantidade de enzimas constitutivas produzida (BEG *et al.*, 2001).

As xilanases ligam-se fortemente ao substrato, dessa forma, uma parte da enzima produzida durante a fermentação é freqüentemente perdida e descartada como enzima ligada, juntamente com o substrato insolúvel. As enzimas metabólicas do produtor de xilanase, tais como proteases também afetam o rendimento da enzima. Estas enzimas são expressas otimamente no final da fase exponencial, portanto o tempo do término da fermentação deve ser correlacionado com a produção destas enzimas no meio considerado. Outros parâmetros do bioprocessamento que podem afetar a atividade e produtividade das xilanases durante a fermentação incluem: o pH, a temperatura, agitação e a aeração (KULKARNI *et al.*, 1999b; HALTRICH *et al.*, 1996).

A velocidade de agitação, a taxa de aeração, o pH e a temperatura têm demonstrado influenciar a produtividade da xilanase por fungos em vários estudos com fermentadores. Entretanto, as condições ótimas são únicas para cada microrganismo e processo. Exemplos podem ser encontrados para: *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 (PALMA *et al.*, 1996), *Thermomyces lanuginosus* (REDDY *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2000; PURKARTHOFFER *et al.*, 1993), *Aspergillus niger* (KIM *et al.*, 1997) e *Aspergillus awamori* (SIEDENBERG *et al.*, 1997).

4.2 - POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS DAS XILANASES

O processo químico de remoção da lignina da polpa para produzir polpa final clara ou completamente branca é chamado branqueamento. O processo de branqueamento atualmente da polpa “kraft” utiliza grandes quantidades de compostos químicos baseados no cloro e bissulfito de sódio. Esses químicos branqueadores causam vários problemas nos efluentes das indústrias de papel e celulose. Os subprodutos da utilização desses químicos são substâncias organocloradas, algumas das quais são tóxicas, mutagênicas, persistentes e bioacumulantes e causam diversos distúrbios prejudiciais aos sistemas biológicos. Uma alternativa ao processamento convencional é o uso das enzimas, as quais têm fornecido um caminho simples e econômico para reduzir o uso de cloro e outros químicos branqueadores. A xilanase pode reduzir o requerimento de químicos oxidantes em torno de 20 a 40% (BEG *et al.*, 2001).

As xilanases possuem um papel importante na retirada da casca, remoção da cor das fibras recicladas e na purificação da celulose para a preparação da polpa solubilizada. O pré-tratamento com xilanase tem diminuído o consumo de reagentes químicos no branqueamento e resultando em maior índice de brilho final. O clareamento enzimático resulta da quebra da ligação entre a lignina e a xilana e a abertura da estrutura da polpa (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2000).

O pré-tratamento enzimático tem se mostrado satisfatoriamente compatível com os equipamentos industriais existentes. A adição de um passo enzimático para qualquer sequência convencional de branqueamento resulta em um maior valor do índice de brancura final da polpa. O maior número de experiências industriais tem sido realizado na Europa, principalmente na Escandinávia, onde a maior parte da polpa “kraft” é produzida (KULKARNI *et al.*, 1999b).

As xilanases também encontram aplicações nas indústrias de panificação e forragem, devido à presença de substancial quantidade de hemicelulose na matéria-prima. Nos produtos de panificação, as xilanases agem na fração glúten da massa e auxiliam na redistribuição do conteúdo de água do pão, assim melhorando significativamente a textura, o volume da massa e o tempo de prateleira (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002). As xilanases são usadas freqüentemente com as celulasas e as pectinases para clarificar vinhos

e sucos, e para liquefazer frutas e vegetais, e no pré-tratamento da forragem para melhorar a digestibilidade do alimento dos ruminantes e para facilitar a compostagem (BEG *et al.*, 2001).

Outra aplicação encontra-se na indústria de processamento de alimentos, que já está utilizando as preparações enzimáticas comerciais produzidas pela Novo Nordisk. A preparação fúngica de β -glucanase de *Aspergillus niger*, comercializada com o nome Finizyme, é utilizada na fermentação da cerveja para evitar problemas de filtração e turvação causados pelas β -glucanas. As xilanases também possuem um papel importante para extração de café, óleos vegetais, amido, flavorizantes e pigmentos. Esses potenciais biotecnológicos das xilanases têm estimulado a pesquisa de enzimas adequadas e tecnologias para produção econômica em grande escala (KULKARNI *et al.*, 1999b).



5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.-Å. Partition of cell particles and macromolecules, 3 ed, Wiley, New York, 1986.

ANDERSSON, E., HAHN-HÄGERDAL, B. High concentrations of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force: α -amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two-phase systems and PEG solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, p. 329-336, 1988.

ANTOV, M.G., PERICIN, D.M., DIMIC, G.R. Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. *J. Biotechnol.*, v. 91, p. 83-87, 2001.

BEG, Q.K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 56, p. 326-338, 2001.

CHEN, J.P., LEE, M.S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 17, p. 1021-1027, 1995.

CHRISTIAN, T.J., MANLEY-HARRIS, M., RICHARDS, G.N. A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems. *Carbohydr. Polym.*, v. 35, p. 7-12, 1998.

COSTA, M.J.L., CUNHA, M.T., CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole broth extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase. *Bioseparation*, v. 9, p. 231-238, 2000.

COSTA, S.M.O., RODRIGES, J.F., DE PAULA, R.C.M. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: goma do cajueiro. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, abr/jun, p. 49-55, 1996.

DIAMOND, A.D., HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v.47, p. 89-134, 1992.

- DROUIN, C.M., COOPER, D.G. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 40, p. 86-90, 1992.
- GESSESSE, A., MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. By using solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 25, p. 68-72, 1999.
- HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K.D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.*, v. 58, p. 137-161, 1996.
- HOTHA, S., BANIK, R.M. Production of alkaline protease by *Bacillus thurigiensis* H14 in aqueous two-phase systems. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 69, p. 5-10, 1997.
- ILIEVA, M.P., BAKALOVA, A., MIHNEVA, M., PAVLOV, A., DOLAPCHIEV, L. Production of phosphomonoesterases by *Nicotiana tabacum* 1507 in an aqueous two-phase system. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 51, p. 488-493, 1996.
- JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochem.*, v.30, p. 705-709, 1995.
- KADOWAKI, M.K., SOUZA, C.G.M., SIMÃO, R.C.G., PERALTA, R.M. Xylanase production by *Aspergillus tamari*. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 66, p. 97-106, 1997.
- KARNI, M., DEOPURKAR, R.L., RALE, V.B. β -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 9, p. 476-478, 1993.
- KIM, S.W., KANG, S.W., LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Biores. Technol.*, v. 59, p.63-67, 1997.
- KIM, Y.J., WEIGAND, W.A. Experimental analysis of a product inhibited fermentation in an aqueous two-phase system. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 34/35, p. 419-430, 1992.
- KRONER, K.H., HUSTEDT, H., KULA, M.R. Evaluation of crude dextran as phase-forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 24, p. 1015-1045, 1982.
- KUBOI, R., MARULI, T., TANAKA, H., KOMASAWA, I. Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 78, p. 431-436, 1994.

KUBOI, R., UMAKOSHI, H., KOMASAWA, I. Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly (ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system to produce intracellular β -galactosidase. *Biotechnol. Prog.*, v. 11, p. 202-207, 1995.

KUHADA, R.C., MANCHANDA, M., SINGH, A. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.*, v. 33, p. 641-647, 1998.

KULA, M.R., KRONER, K.H., HUSTED, T.H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. *Adv. Biochem. Eng.*, v. 24, p. 73-118, 1982.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 23, p. 411-456, 1999b.

KULKARNI, N., VAIDYA, A., RAO, M. Extractive cultivation of recombinant *Escherichia coli* using aqueous two-phase system for production and separation of extracellular xylanase. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v. 255, p. 274-278, 1999a.

KWON, Y.J., KAUL, R., MATTIASSON, B. Extractive lactic acid fermentation in poly(ethylenimine)-based aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 50, p. 280-290, 1996.

LEE, Y.H., CHANG, H.N. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 69, p. 89-92, 1990.

LI, C., OUYANG, F., BAI, J. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO₄ . 7H₂O aqueous two-phase system to produce nisin. *Biotechnol. Lett.*, v. 22, p. 843-847, 2000.

MAHESWARI, M.U., CHANDRA, T.S. Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 16, p. 257-263, 2000.

MENESTRINA, J.M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, A.J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anarcadium occidentale*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 715-721, 1998.

MILAGRES, M.F., PRADE, R.A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, p. 627-632, 1994.

MOTHÉ, C.G., RAO, M.A. Rheological behavior of aqueous dispersions on cashew gum and gum Arabic: effect of concentration and blending. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 501-506, 1999.

OLIVEIRA, L.A., SARUBBO, L.A., PORTO, A.L.F., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TAMBOURGI, E.B. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. *Process Biochem.*, v. 38, p. 693-699, 2002a.

OLIVEIRA, L.A., SARUBBO, L.A., PORTO, A.L.F., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TAMBOURGI, E.B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, v. 766, p. 27-36, 2002b.

PALMA, M.B., MILAGRES, A.M.F., PRATA, A.M.R., MANCILLHA, I.M. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinelum*. *Process Biochem.*, v. 31, p. 141-145, 1996.

PAULA, R.C.M., RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohydr. Polym.*, v. 26, p. 177-181, 1995.

PERSSON, I., STALBRAND, H., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Semicontinuous production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 in an aqueous two-phase system. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 27, p. 27-36, 1991b.

PERSSON, I., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of cultivation conditions on the production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 in an aqueous two-phase systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 27, p. 9-25, 1991a.

PERSSON, I., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Production of β -glucosidase by *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Tech.*, v. 3, p. 265-270, 1989.

PLANAS, J., RADSTROM, P., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. enhanced production of lactic acid through the use of a novel aqueous two-phase system as an extractive fermentation system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 45, p. 737-743, 1996.

PUCHART, V., KATAPODIS, P., BIELY, P., KREMnický, L., CHRISTAKOPOULOS, P., VRŠANSKÁ, M., KEKOS, D., MACRIS, B.J., BHAT, M.K. Production of xylanases,

mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 24, p. 355-361, 1999.

PURKARTHOFFER, H., SINNER, M., STEINER, W. Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol. Lett.*, v. 15, p. 405-410, 1993.

RAMADAS, M., HOLST, O., MATTIASSON, B. Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 12, p. 267-271, 1996.

RANI, D.S., NAND, K. Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochem.*, v. 36, p. 355-362, 2000.

REDDY, V., REDDY, P., PILLAY, B., SINGH, S. Effect of aeration on the production of hemicellulases by *T. lanuginosus* SSBP in a 30 l bioreactor. *Process Biochem.*, v. 37, p. 1221-1228, 2002.

RITO-PALOMARES, M., NEGRETE, A., MIRANDA, L., FLORES, C., GALINDO, E., SERRANO-CARRÓN, L. The potential application of aqueous two-phase system for in situ recovery of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 28, p. 625-631, 2001.

RODRIGUES, J.F., PAULA, R.C.M., COSTA, S.M. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), Polímeros: Ciência e Tecnologia, Jan/Mar, p. 31-36, 1993.

SARUBBO, L.A., OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., DUARTE, H.S., CARNEIRO-LEÃO, A.M.A., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TAMBOURGI, E.B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. *J. Chromatogr. B*, v. 743, p. 79-84, 2000.

SIEDENBERG, D., GERLACH, S.R., CZWALINNA, A., SCHUGERL, K., GIUSEPPIN, M.L.F., HUNIK, J. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. *J. Biotechnol.*, v. 56, p. 205-216, 1997.

SILVA, M.E., FRANCO, T.T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing – a review paper. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v.17, p. 1-17, 2000.

- SINGH, S., du PREEZ, J.C., PILLAY, B., PRIOR, B.A. The production of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* strain SSBP: influence of agitation and dissolved oxygen tension. *Appl. Microbiol. Technol.*, v. 54, p. 698-704, 2000.
- SINHA, J., DEY, P.K., PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 54, p. 476-486, 2000a.
- SINHA, J., DEY, P.K., PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei*/*Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. *Biochem. Eng. J.*, v. 6, p. 163-175, 2000b.
- SKUSE, D.R., NORRIS-JONES, R., YALPANI, M., BROOKS, D.E. Hydroxypropyl cellulose/ poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 14, p. 785-790, 1992.
- STREDANSKÝ, M., SVORC, R., STURDÍK, E., DERCOVÁ, K. Repeated batch α -amylase production in aqueous two-phase system with *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.*, v. 27, p. 181-191, 1993.
- STURESSON, S., TJERNELD, F., JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 26, p. 281-295, 1990.
- SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. Biotechnology of Microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v. 22, p. 33-64, 2002.
- SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 183, p. 1-7, 2000.
- SZLAG, D.C., GIULIANO, K.A. A low-cost aqueous two phase system for enzyme extraction. *Biotechnol. Tech.*, v. 2, p. 277-282, 1988.
- TECHAPUN, C., CHAROENRAT, T., WATANABE, M., SASAKI, K., POOSARAN, N. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochem. Eng. J.*, v. 12, p. 99-105, 2002.
- TECHAPUN, C., POOSARAN, N., WATANABE, M., SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and

the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.*, v. 38, p. 1327-1340, 2003.

TJERNELD, F., JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems for biotechnical use. *Bioseparation*, v. 1, p. 255-263, 1990.

UMAKOSHI, H., YANO, K., KUBOI, R., KOMASAWA, I. Extractive cultivation of recombinant *Escherichia coli* using aqueous two-phase system for production and separation of intracellular heat shock proteins. *Biotechnol. Prog.*, v. 12, p. 51-56, 1996.

VAN DER POL, L.A., PAIJENS, I., TRAMPER, J. Dextran as protectant against damage caused by sparging for hybridoma cells in a bubble column. *J. Biotechnol.*, v. 43, p. 103-110, 1995.

VENÂNCIO, A., ALMEIDA, C., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system. *Bioseparation*, v.5, p. 253-258, 1995.

VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J.A., MOTA, M. Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer. *Biotechnol. Prog.*, v. 9, p. 635-638, 1993.

ZIJLSTRA, G.M., GOOLJER, C.D., VAN DER POL, L.A., TRAMPER, J. Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: a first step toward extractive bioconversions. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 19, p. 2-8, 1996.

Capítulo 2

O presente trabalho consiste na investigação da produção de xilanase pelo fungo *P. janthinellum* utilizando cinco resíduos agroindustriais como indutores (bagaço de cana, casca de aveia, casca de mandioca, sabugo e casca de grão de milho). Os melhores indutores foram o sabugo de milho e a casca de aveia.

Este trabalho foi publicado parcialmente no Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, 2002, e foi submetido para publicação no periódico *Bioresearch Technology*.

Influence of agricultural wastes on xylanase production by *Penicillium janthinellum*

Luciana A. Oliveira^{1,2*}, Ana L. F. Porto^{2,3}, Elias B. Tambourgi¹

1- Departamento de Sistemas Químicos e de Informática – UNICAMP¹

2- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Campus Universitário, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: o_luciana@hotmail.com

3- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Abstract

Five agricultural wastes were evaluated in submerged fermentation for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janthinellum*. The wastes were hydrolyzed in acid medium and the liquid fraction was used for cultivation. Microorganism growth was carried out at 30°C, 60 rpm and initial pH around 5. Corn cob (55.3 U/mL) and oat husk (54.8 U/mL) were the best inducers of xylanase. Sugar cane bagasse (23.0 U/mL) and corn husk (23.8 U/mL) were moderately good, while cassava peel was negligible. The maximum biomass yields were 1.30 and 1.17 g/L for cassava peel and corn husk after 180 h, respectively. Xylanolytic activity showed a cell growth associated profile.

Keywords: Xylanase production; *Penicillium janthinellum*, Agricultural residues; Submerged fermentation; Biomass

1. Introduction

Vegetal waste materials constitute the most abundant renewable natural resource. Plant biomass is essentially lignocellulose. Cellulose is the principal constituent of most plants. Hemicelluloses rank next to cellulose as the most abundant renewable vegetal matter present on earth. Lignocelluloses are estimated at several billion tons annually (Okeke and Obi, 1994). Several processes have been developed that utilize agro-industrial residues as raw materials for the production of bulk chemicals and value-added fine products such as ethanol, enzymes, single-cell protein. Application of agro-industrial residues in bioprocesses on the one hand provides alternative substrates, and on the other hand helps in solving pollution problems, which their disposal may otherwise cause (Pandey et al., 2000).

The use of microbial enzymes for the hydrolysis of polysaccharides in lignocellulosic materials is widely researched because of the importance of hydrolysis products (soluble sugars) in fermentation processes for the production of fuel, chemicals and food and feed. Since xylan is the major component of plant hemicellulose, most investigations of the enzymic degradation of hemicellulose have focused on xylanolytic enzymes, such as xylanase (Kuhada et al., 1998). Xylanases are produced by numerous microorganisms among which the fungi are the most potent producers. Xylanase from fungi have been well documented and intensively studied (Pham et al., 1998).

Xylanase has a wide range of potential biotechnological applications. It is already produced on an industrial scale for use as a food additive for poultry to increase feed efficiency and in wheat flour for improving dough handling and the quality of baked products. Recently the interest in xylanase has markedly increased due to the potential industrial uses, particularly in pulping and bleaching processes, using cellulase-free preparations (Dhillon et al., 2000). A strain of *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115, a filamentous fungus, was described as a good producer of xylanase in submerged fermentation using sugar cane bagasse (Milagres and Prade, 1994; Palma et al., 1996). Therefore, the purpose of this study was to investigate the ability of this strain to produce xylanolytic enzymes using different agricultural residues hydrolysates.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism

The microorganism *Penicillium janthinellum*, isolated from decaying wood found in a local termite colony by Milagres (1988), was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection under the designation CRC 87M-115.

2.2. Preparation of agro-industrial residue acid hydrolysate

In order to prepare hydrolysates for fermentation, 800 g of dry milled lignocellulosic materials (cassava peel, corn cob, corn husk, oat husk and sugar cane bagasse) was mixed with 8 L of sulphuric acid solution (0.25%) and hydrolyzed for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH 1M. Corn cob was collected in various localities in Venturosa, Pernambuco State, Brazil. Cassava peel, corn husk, oat husk and sugar cane bagasse were provided by Feira Nova Flour Industry (Pernambuco, Brazil), Corn Products do Brasil (Pernambuco, Brazil), L. Ferenczi Ind Com LTDA (São Paulo, Brazil) and Japungu Agroindustrial S.A. (Paraíba/Brazil), respectively.

2.3. Cultivation medium and enzyme production

The fungus was cultivated at 30°C for 5 days in medium containing 1% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated complete salts solution based on Vogel's medium (1956) and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. The cultivation medium for enzyme production consisted of the above residue hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium (1956) and 0.1% yeast extract. The medium was then autoclaved for 15 min at 121°C. The spore inocula were obtained by suspending spores in water, filtering through gauze and pouring the filtrate into erlenmeyer flasks. The final concentration of spores was 10^6 /mL. The

cultivation was carried out for 298 h in erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of medium at 30°C, initial pH 5.5 (uncontrolled) and 60 rpm.

2.4. Enzymes assays

Extracellular xylanase activity was determined by incubation 0.1 mL of diluted culture filtrate with 0.9 mL of a 'Birchwood' xylan suspension (10.0 g/L) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C, according to the method described by Bailey et al. (1992). The reducing equivalents released were measured by a colorimetric assay (Miller, 1959) using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per minute at 50°C. Total extracellular acid and basic proteases were assayed at 25°C as described by Beynon and Bond (1990), using azocasein 1.0% (w/v) (Sigma), in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 1.0 mM CaCl₂, as substrate for alkaline protease and azoalbumin 1.0% (w/v) (Sigma), in 0.2 M acetate buffer, pH 5.5, for acid protease. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that produces an increase in the optical density of 1.0 at 440 nm in 1 hour.

2.5. Dry biomass

Dry biomass of total cell mass was obtained by filtering samples and drying the mycelia to constant weight at 100°C.

2.6. Protein determination

The amount of total protein was determined according to the Coomassie Blue method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin as a protein concentration standard.

2.7. Determination of fermentation parameters

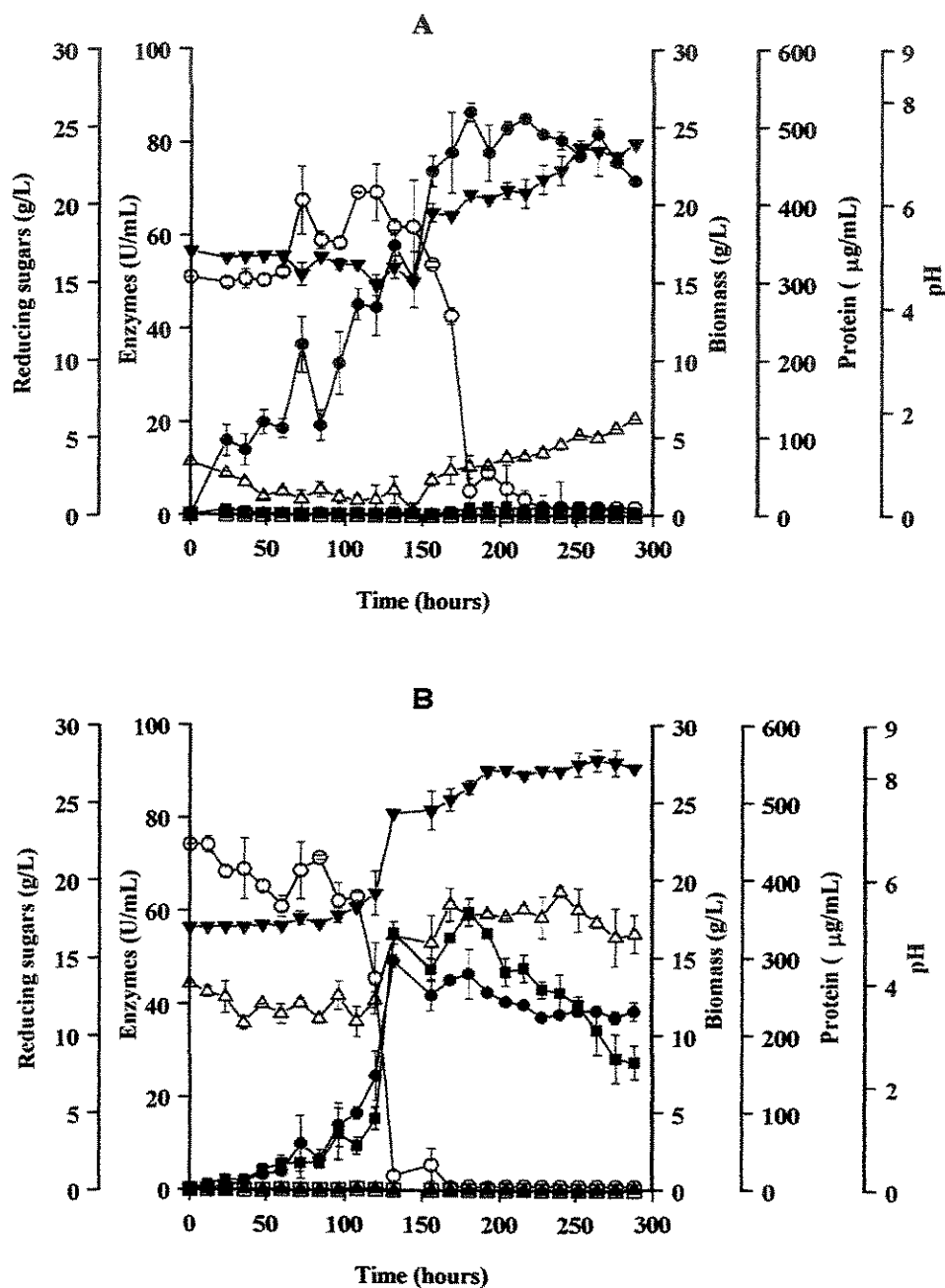
The maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) was determined from the slope of a semi-logarithmic plot of cell mass (g/L) versus time and the volumetric rate of xylanase production (Q_p) was calculated from the slope of xylanase activity versus time curve.

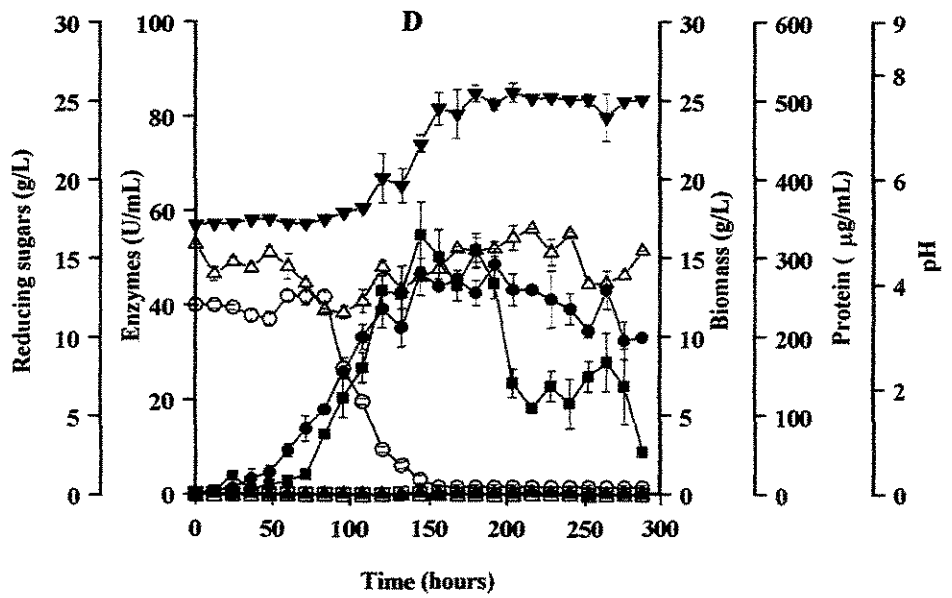
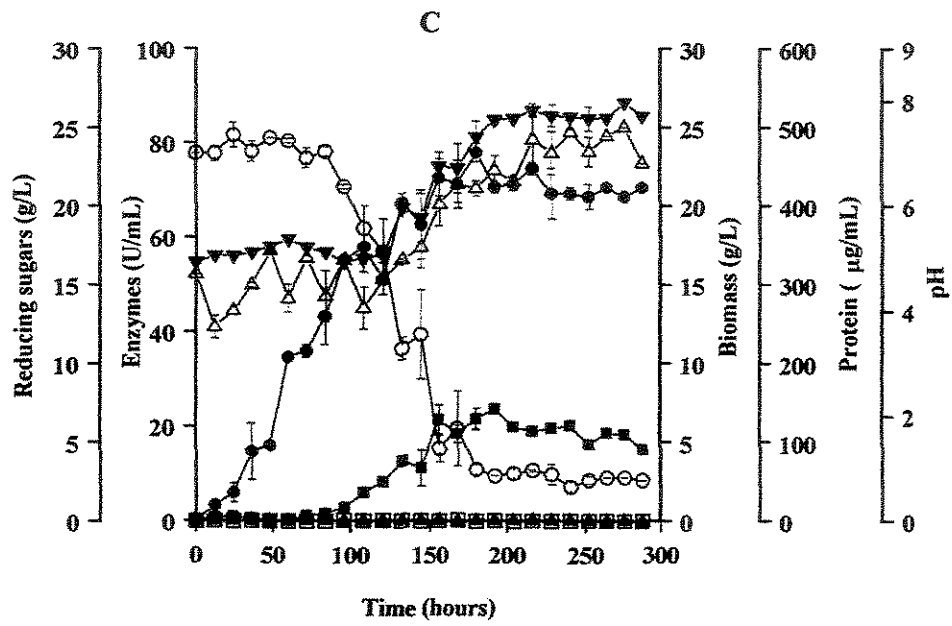
3. Results and Discussion

Previously, *P. janthinellum* has been found to grow well and to produce a high xylanase activity, with low levels of cellulase, in submerged fermentation using sugar cane bagasse hydrolysate (Palma et al., 1996) or hemicelluloses from steam-exploded sugar cane bagasse (Milagres and Prade, 1994) as the main substrate. Hemicellulose hydrolysis by acid is a random cleavage of the structure. The composition and structure of hemicelluloses differ from plant to plant. This causes considerable variation in the hydrolysis rate of xylan (Eken-Saraçoglu et al., 1998). The choice of an appropriate substrate is of great importance for the successful production of xylanases. The substrate not only serves as carbon and energy source, but also provides the necessary inducing compounds for the organism, preferentially for an extended period of time, since then a prolonged production phase can result in an increased overall productivity of the fermentation process (Haltrich et al., 1996). Hence we studied the production of xylanase by *P. janthinellum* fermentation in different lignocellulosic hydrolysates. Therefore xylanase, biomass, reducing sugars, protein content, pH and protease activities were analyzed with respect to time (Fig. 1).

Among five agricultural residues, corn cob (54.8 U/mL) and oat husk (55.3 U/mL) were the best inducers of xylanase by *P. janthinellum*. Probably due to the high hemicellulose content of these residues (Table 1). The xylanolytic activities in sugar cane bagasse and corn husk were 23.0 and 23.8 U/mL, respectively. Nevertheless, negligible activity was achieved in cassava peel, which had low hemicellulose content (Table 1). Although for this substrate and corn husk the maximal cell growth was obtained (Fig. 1). Onilude (1996) also observed low xylanase production in cassava peel by *Trichoderma harzianum* on solid-state fermentation. Dhillon et al. (2000) found that sugar cane bagasse

and oat husk were the most effective substrates for xylanase production by *Bacillus circulans* when compared to corn cob.





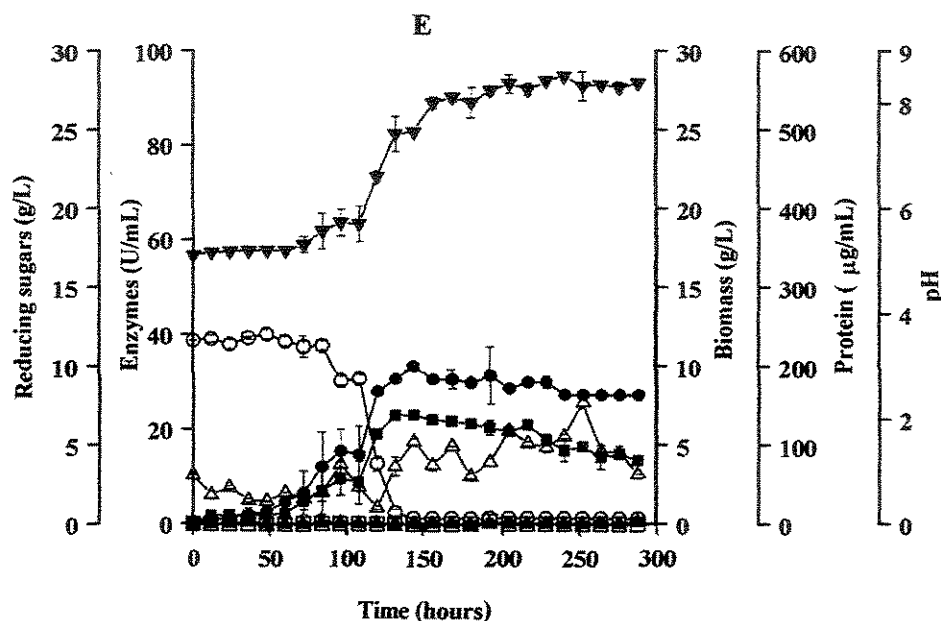


Fig.1- Time course of growth and enzyme production by *P. janthinellum* in A- cassava peel, B-corn cob, C- corn husk, D- oat husk and E- sugar cane bagasse hydrolysates. Growth was monitored by dry mycelial weight and enzyme activity was assayed from cell free culture supernatant. Xylanase (■), biomass (●), protein content (Δ), acid protease (▲), alkaline protease (□), reducing sugars (O) and pH (▼). Fungi were grown at 30°C and 60 rpm. Each experiment above was repeated two times

Table 1- Agro-wastes lignocellulose compositions

Component	Composition (%)				
	Cassava peel (Aregheore, 2000)	Corn cob (Singh and Kalra, 1978)	Corn husk (Hang and Woodams, 1999)	Oat husk (Welch et al., 1983)	Bagasse (Dueñas et al., 1995)
Cellulose	13.8	34.1	38.2	27.4-37.3	44
Hemicellulose	11.0	42.5	44.5	31.0-38.4	23
Lignin	7.2	12.8	6.6	2.3-9.8	20
Protein	7.2	1.64	1.9	1.6-5.8	2
Ash	14.2	5.46	2.8	2.4-9.3	3.5

The maximum biomass yields were 1.30 and 1.17 g/L for cassava peel and corn husk after 180 h, respectively. However lower yields were reached for corn cob (0.74 g/L at 132 h), oat husk (0.70 g/L at 144 h) and sugar cane bagasse (0.50g/L at 132 h). Xylanase production by *P. janthinellum* attained its maximum value at 132h in sugar cane bagasse and corn cob, while in oat husk and corn husk the maximal activity was reached at 144 h and 156 h, respectively. Low levels of xylanase were produced until 84 h, after that the enzyme amount increased continuously following the biomass raise, suggesting that the xylanase production by *P. janthinellum* is growth associated. Similar observations were reported for xylanase production by *Melanocarpus albomyces* (Jain, 1995) and *Bacillus polymyxa* (Pham et al., 1998) using lignocellulosic wastes.

The xylanase activity increases when reducing sugar concentrations present in medium decrease. Therefore, the highest activity was achieved at very low reducing sugar concentration (Fig. 1B-E). Several reports have shown xylanase induction by lignocelluloses such as corn cobs, sugar cane bagasse, wheat bran and rice straw. In some cases, readily metabolizable sugars, such as glucose and/or xylose, are suppressors of xylanase synthesis. Milagres et al. (1993) observed that the xylanase production by *P. janthinellum* was inhibited in the presence of monosaccharides such as glucose, fructose and disaccharide such sucrose. Xylanase production by *Bacillus* sp was repressed upon addition of different sugars to wheat bran in solid-state fermentation (Gessesse and Mamo, 1999). The authors found that the effect of glucose was concentration dependent, which lead to 60 and 90% repression at concentration of 10 and 15% (w/w), respectively. Similar results were related by others authors (Kuhada et al., 1998; Souza et al., 2001).

The co-production of high proteolytic activity may be a serious problem for the maintenance of xylanase stability. Fortunately, low levels of acid and alkaline proteases were produced during the fermentation of the residues by *P. janthinellum* (Fig. 1). These results may be explained by the chemical composition of these materials, which contained low protein in their composition (Table 1), except for cassava peel. Similar observations were reported for xylanase production by *Penicillium janthinellum* CRC 87-115 using oat spelt and birchwood xylan (Curotto et al., 1994) and by *Aspergillus tamarri* in solid state fermentation using corn cob and sugar cane bagasse (Ferreira et al., 1999) where low levels of protease were found.

After reached the maximum, it was observed a reduction in the xylanase activity (Fig. 1B-E). Perhaps this decrease in the activity is due to the rise of pH. Milagres et al. (1993) demonstrated that the xylanase from *P. janthinellum* was unstable at pH higher than 6.0. They also observed that about 65% of the enzyme activity was lost at pH 7.0, after 4 hours between 30 and 40°C. The Figure 1B-E shows that for all residues, after reached maximum pH values (7.7-8.3), the xylanase activities decreased slightly (bagasse and corn husk) or markedly (corn cob and oat husk). The cost of agro-wastes and some kinetic parameters are summarized in Table 2. Corn cobs and oat husk obtained higher volumetric productivity and are among the lower cost residues.

Penicillium xylanases are known from *P. janthinellum* (Palma et al., 1996), *P. funiculosum* (Mishra et al., 1985), *P. Herquei* (Funaguma et al., 1991), *P. chrysogenum* (Haas et al., 1992), *P. capsulatum* (Filho et al., 1993), *P. purpurogenum* (Steiner et al., 1994) and *P. wortamanni* (Haltrich et al, 1996). Production of xylanases by different *Penicillium* species are shown in Table 3. The volumetric productivity, which is an important parameter to assess the effectiveness of a process, was calculated from the xylanase activities reported for these processes in the literature. Although some *Penicillium* sp. are known to produce xylanase, here it was produced a high xylanase activity which is comparable or higher than that reported for most *Penicillium* in submerged cultivations (Table 3).

Table 2- Kinetic parameters of *Penicillium janthinellum* growth and agro-industrial residues costs.

Agroindustrial residues	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Q _P (U/Lh)	Cost (U\$/ton)
Cassava peels	0.013	9	30 ^a
Corn husks	0.011	138	70 ^b
Sugar cane bagasse	0.030	174	10 ^c
Corn cobs	0.031	419	24.5 ^d
Oat husk	0.034	381	25 ^e

Residues costs were provided by: ^aFeira Nova Flour Industries (Pernambuco, Brazil), ^bCorn Products do Brasil (Pernambuco, Brazil), ^cJapungu Agroindustrial S.A. (Paraíba, Brazil), ^dRASUL - Indústria e Comércio de Rações LTDA (Paraná, Brazil) and ^eL. Ferenczi Ind Com LTDA (São Paulo, Brazil).

Cassava peel, corn cob, sugar cane bagasse and oat husk are agricultural wastes which are abundant in Brazil. They could be used as materials for developing several biotechnological processes of industrial interest. The strain of *P. janthinellum* studied here grow well in these hemicellulosic agricultural residues hydrolysates, but yielded higher xylanase activities were found in corn cob and oat husk. The production of xylanase may be improved by a further optimization of the medium and the culture conditions.

Table 3- Xylanase production by different *Penicillium* species in submerged cultivations

Species	Substrate	Cultivation conditions	Xylanase		Reference
			Activity (U/mL)	Product (U/L.h)	
<i>P. janthinellum</i>	Corn cob	Shake flask,	55.3	419	This work
CRC 87M-115	hydrolysate	30°C, 132 h			
	Oat husk	Shake flask,	54.8	381	This work
	hydrolysate	30°C, 144 h			
<i>P. funiculosum</i>	Cellulose + wheat bran	Shake flask, 28°C, 10 days	16.0	77	Mishra et al. (1985)
<i>P. kloeckeri</i>	Birchwood xylan	Shake flask, 26 -28°C, 5 days	12.2	102	Haltrich et al. (1996)
NRRL1017					
<i>P. pinophilum</i>	Avicel + barley straw	12 L fermentation, 35°C, 10 days	27.3	114	Brown et al. (1987)
NTG III/6					
<i>P. purpurogenum</i>	Wheat straw	Shake flask, 28°C, 12 days	10.4	36	Steiner et al. (1994)
<i>P. chrysogenum</i>	Oat spelt xylan	Shake flask, 28°C, 48 h	20.5	426	Haas et al. (1992)
<i>P. herquei</i>	Avicel + xylan	Shake flask, 30°C, 7 days	3.5	21	Funaguma et al. (1991)

4. Acknowledgements

We would like to thank for José Olimpio Marques Coelho, Brazil *Corn Products*, L. Ferenczi Ind Com LTDA and Japungu Agroindustrial S.A. for gifts of cassava peel, corn husk, oat husk and sugar cane bagasse, respectively. Luciana A. Oliveira acknowledge receipt of a research fellowship from CNPq (Brasil). We especially appreciated the comments and suggestions of Givanildo B. Oliveira.

5. References

- Aregheore, E.M., 2000 Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants – in vivo and in vitro digestibility. *Animal Feed Sci. Technol.* 85, 99-109.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257-270.
- Beynon, R.J., Bond, J.S., 1990. Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford University Press.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, J.A., Collin S.A., Wood, T.M., 1987. Development of a medium for high cellulase, xylanase and β -glucosidase production by a mutant strain (NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 355-360.
- Curotto, E., Concha, M., Campos, V., Milagres, A.M.F., Duran, N., 1994. Production of extracellular xylanases by *Penicillium janthinellum*. Effect of select growth conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48, 107-116.

- Dhillon, A., Gupta, J.K., Jauhari, B.M., Khanna, S., 2000. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Biores. Technol.* 73, 273-277.
- Dueñas, R., Tengerdy, R.P., Gutierrez-Correa, M., 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 333-337.
- Eken-Saraçoglu, N., Mutlu, S.F., Dilmaç, G., Çavusoglu, H., 1998. A comparative kinetic study of acidic hemicellulose hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Biores. Technol.* 65, 29-33.
- Ferreira, G., Boer, C.G., Peralta, R.M., 1999. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaris* in solid state fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 335-339.
- Filho, E.X.F., Puls, J., Coughlan, M.P., 1993. Biochemical characteristics of two endo- β -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *J. Ind. Microbiol.* 11, 171-180.
- Funaguma, T., Naito, S., Morita, M., Okumura, M., Sugiura, M., Hara, A., 1991. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* banier and sartory. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1163-1165.
- Gessesse, A., Mamo, G., 1999. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 68-72.
- Haas, H., Herfurth, E., Stoffler, G., Redl, B., 1992. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1117, 279-286.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., Zupancic, S. 1996. Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.* 58, 137-161.
- Hang, Y.D., Woodams, E.E., 1999. Enzymatic production of soluble sugars from corn husks. *Food Sci. Technol.* 32, 208-210.
- Jain, A., 1995. Production of xylanase by Thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochem.* 30, 705-709.

- Kuhada, R.C., Manchanda, M., Singh, A., 1998. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.* 33, 641-647.
- Milagres, A.M.F., 1988. Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*. Viçosa: Tese de Mestrado, UFV.
- Milagres, A.M.F., Lacis, L.S., Prade, R.A., 1993. Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 248-253.
- Milagres, A.M.F., Prade, R.A., 1994. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 627-632.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Mishra, C., Seeta, R., Rao, M., 1985. Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 295-299.
- Okeke, B.C., Obi, S.K.C., 1994. Lignocellulose and sugar compositions of some agro-waste materials. *Biores. Technol.* 47, 283-284.
- Onilude, A.A., 1996. Effect of cassavar cultivar, age and pretreatment processes of cellulase and xylanase production from cassava waste by *Trichoderma harzianum*. *J. Basic Microbiol.* 36, 421-431.
- Palma, M.B., Milagres, A.M.F., Prata, A.M.R., Mancilha, I.M., 1996. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochem.* 31, 141-145.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Biores. Technol.* 74, 81-87.
- Pham, P.L., Taillandier, P., Delmas, M., Strehaiano, P., 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. *Ind. Crops Prod.* 7, 195-203.

- Singh, A., Kalra, M.S., 1978. Single cell protein production from corn cobs. *J. Food Sci. Technol.* 15, 249-252.
- Souza, D.F., Souza, C.G.M., Peralta, R.M., 2001. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarri* in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 36, 835-838.
- Steiner, J., Socha, C., Eyzaguirre, J., 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 280-284.
- Vogel, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microb. Gen. Bull.* 13, 42-43.
- Welch, R.W., Hayward, M.V., Jones, D.I.H., 1983. The composition of oat husk and its variation due to genetic and other factors. *J. Sci. Food Agric.* 34, 417-426.

Capítulo 3

Neste capítulo foi realizado o estudo da influência dos parâmetros da fermentação (agitação, tempo de cultivo, pH inicial e temperatura) sobre o crescimento do *P. janthinellum* e produção de xilanase. Utilizou-se os melhores indutores anteriormente selecionados (sabugo de milho e casca de aveia). Todos os parâmetros estudados foram significativos para produção da enzima. Contudo, para o crescimento celular, apenas o tempo de cultivo e o pH inicial foram significativos.

O trabalho foi submetido para a publicação no periódico FEMS Microbiology Letters.

A factorial design study of xylanase production by *Penicillium janthinellum*

Luciana A. Oliveira^{1,2*}, Benício Barros Neto³, Ana L. F. Porto^{2,4}, Elias B. Tambourgi¹

1- Departamento de Sistemas Químicos e de Informática – UNICAMP

2- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Campus Universitário, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: o_luciana@hotmail.com

3- Departamento de Química Fundamental – UFPE

4- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Abstract

Xylanase production by *Penicillium janthinellum* in submerged fermentation was studied with a full two-level factorial design. Five process parameters, cultivation time, temperature, agitation, pH and agro-industrial residue were investigated and found statistically significant for enzyme production. For cellular growth, only cultivation time and initial substrate pH were significant. Highest xylanase production and cellular growth, 142.85 U/mL and 0.33 g/20mL, were obtained with cultivation times of 144 hours.

Keywords: Enzyme production; *Penicillium janthinellum*, Microbial growth, Experimental design, Agricultural residues; Submerged culture

1. Introduction

In recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization of the agro-industrial residues generated in large amounts during the processing of raw materials. Most of these residues do not find any application and their disposal in the environment causes rather serious pollution concerns. One potential application of these residues is their utilization as substrate carbon source in bioprocesses. Several processes have been reported that utilize these residues as raw material for the production of bulk chemicals and value-added products such as ethanol, single-cell protein and enzymes. Application of agro-industrial residues in bioprocesses not only provides alternative substrates, but also helps solving their disposal problem [1].

Xylan, a heteropolymer of (β -1-4)-linked xylose, is the most abundant natural polysaccharide after cellulose and accounts for 20 to 30% dry weight of agricultural residues [2]. Interest has been growing in xylanases free of cellulases to remove xylan selectively from lignocellulose without affecting the cellulose fiber length. These applications include their use in the pulp and paper industry, mainly in the production of cellulose pulp and the pre-treatment of pulp to boost the bleaching process [3]. The importance of xylanases is not restricted to the paper and pulp industry; there are other industries with equal importance of applicability. Potential applications of xylanases also include the bioconversion of lignocellulosic material and agro-wastes to fermentative products, clarification of juices, improvement in the consistency of beer, and the digestibility of animal feed stock [4]. Endo-1,4- β -D-xylanase is produced by a wide variety of microorganisms, among which fungi are the most potent producers [5].

For a broad application, the cost of enzymes is one of the main factors determining process economics [6]. Reducing the costs of enzyme production by optimizing the fermentation medium and the fermentation of variables, such as pH, temperature, and agitation is therefore important for industrial application. Different statistical designs to enhance xylanase production by several microorganisms have been successfully employed, mainly for fungi such as *Aspergillus terreus* [5], *Schizophyllum commune* [7], *Sclerotium rolfsii* [8], *Thermoascus aurantiacus* [9], *Thermomyces lanuginosus* [10], as well as bacteria, like *Bacillus circulans* [11] and *Streptomyces* sp [12]. These statistical methods, as

compared to the common 'one-factor at-a time' method, proved to be powerful and useful tools [13].

The aim of this work was to apply a full two-level factorial design to evaluate the influence of the variables agro-industrial residue, incubation time, agitation, temperature and pH, on the cellular growth and the xylanase production of *Penicillium janthinellum*.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism and growth conditions

The isolation of the microorganism *P. janthinellum* from decaying wood was described by Milagres [14]. It was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection with the designation CRC 87M-115. The fungus was cultivated at 30°C for 5 days in a medium containing 1% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated complete salt solution based on Vogel's medium [15] and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. In order to obtain the spore inocula, spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed on Erlenmeyer flasks. The final spore concentration was 10^6 mL^{-1} .

2.2. Preparation of the agro-industrial residue acid hydrolysate

In order to prepare hydrolysates for fermentation, 800 g of dry milled lignocellulosic materials (corn cob and oat husk) was mixed with 8 L of sulphuric acid solution (0.25%) and sterilized for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 4.5 or 6.5 with NaOH 1M (Table 1). Corn cob was collected in various localities in Venturosa, Pernambuco State, Brazil. Oat husk samples were provided by L. Ferenczi Ind Com LTDA (São Paulo, Brazil).

2.3. Enzyme production

The cultivation medium for enzyme production consisted of the residue hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's

medium [15] and 0.1% yeast extract. The medium was then sterilized for 15 min at 121°C. The influence of the process parameters on cellular growth and xylanase production by *P. janthinellum* was assessed with 2⁵ full factorial design. Table 1 shows maximum and minimum levels of the variables (agro-industrial residue, agitation, cultivation temperature, fermentation time and residue hydrolysate pH value), chosen for the trials in this study.

Table 1- Levels of independent variables in the 2⁵ factorial design

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Agro-industrial residue	Oat husk	-	Corn cob
Agitation (rpm)	40	60	80
Cultivation time (Hours)	96	120	144
Residue hydrolysate pH	4.5	5.5	6.5
Temperature (°C)	25	27.5	30

2.4. Enzyme activity and protein determination

Extracellular xylanase activity was determined by incubating 0.1 mL of diluted culture filtrate with 0.9 mL of a 'Birchwood' xylan suspension (10.0 g/L) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C, according to the method described by Bailey et al. [16]. The reducing equivalents released were measured by a colorimetric assay [17] using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per minute at 50°C. The amount of total protein was determined according to the Coomassie Blue method described by Sedmak and Grossberg [18] using bovine serum albumin as a protein concentration standard.

2.5. Dry biomass

Dry biomass values were obtained by filtering samples and drying the mycelia to constant weight at 100°C.

2.6. Statistical analysis

A statistical software package [19] with experimental design capabilities was used to perform the calculations.

3. Results and Discussion

In a previous study, five different lignocellulosic residues hydrolysates were tested as inducers for production of xylanase by *P. janthinellum* in submerged fermentation systems with corn cob, corn husk, cassava peel, oat husk and sugar cane bagasse. The highest titles were produced in corn cob and oat husk hydrolysates and the range between 96 and 144 hours was the period of the maximal specific growth rate. Because of this, in the present work experiments were carried out using these two substrates. The factor levels for the 2^5 design were defined on the basis of previous researches that used ‘one-factor-at-a-time’ method and which indicated that agitation, temperature and pH of sugar cane bagasse hydrolysate influence the growth and enzyme production by *P. janthinellum* [20,21].

3.1. 2^5 Experimental design to xylanase production and cellular growth

The process parameters that affect the xylanase production and the values of each variable at levels are given in Table 1. The full experimental design and the results obtained in the experiments are shown in Table 2. Xylanase activity values range from 0 to 143 U/mL. Higher than 90 U/mL of xylanase were obtained at the lower levels of agitation and temperature, and the higher cultivation time (assays 5, 6, 13 and 14). These results suggest that the studied variables strongly influenced the xylanolytic activity. To determine the significant factors, we used the Pareto chart, which has been described as a useful tool for identifying which estimated effects are the most important [13]. As it can be seen from Pareto chart (Fig. 1), all factors were found to be significant for xylanase production by *P. janthinellum*. However, the cultivation time had the most important positive effect on enzyme production followed by temperature, with a negative effect. Therefore, increasing

the cultivation time and decreasing the temperature of the fermentation should lead to the enhancement of xylanase production.

As shown in Table 2, the *P. janthinellum* largest growth occurred at the longest cultivation time (assays 5, 7, 13, 15, 16, 31 and 32). The Pareto chart of effects (Fig. 2) shows that only cultivation time and pH were statistically significant for biomass production. Therefore, increasing the cultivation time and pH of the fermentation should enhance the mycelial growth.

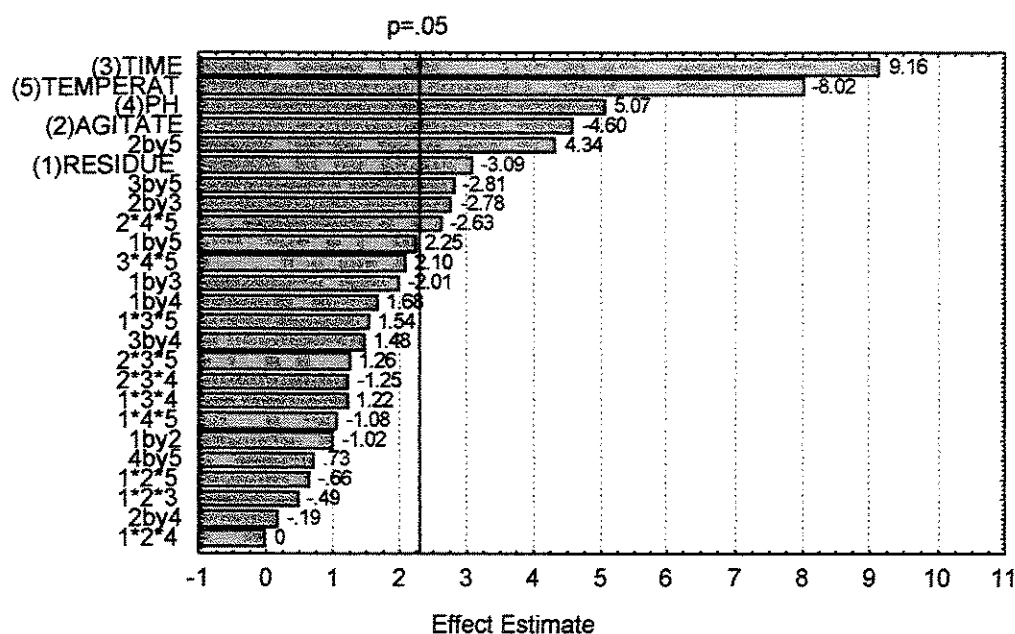


Fig. 1- Pareto chart of effects for the 2^5 experimental design for xylanase activity. The vertical line marks the 95% significance limit.

Table 2- 2⁵ factorial design and results obtained

Run number	Residue (1)	Agitation (2)	Time (3)	pH (4)	Temperature (5)	Xylanase activity (U/mL)	Biomass (g/20mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	44.14	0.142
2	+1	-1	-1	-1	-1	54.4	0.129
3	-1	+1	-1	-1	-1	9.51	0.048
4	+1	+1	-1	-1	-1	0	0
5	-1	-1	+1	-1	-1	142.85	0.298
6	+1	-1	+1	-1	-1	97.10	0.238
7	-1	+1	+1	-1	-1	81.15	0.331
8	+1	+1	+1	-1	-1	0	0
9	-1	-1	-1	+1	-1	49.93	0.148
10	+1	-1	-1	+1	-1	25.41	0.098
11	-1	+1	-1	+1	-1	40.67	0.265
12	+1	+1	-1	+1	-1	29.34	0.167
13	-1	-1	+1	+1	-1	138.8	0.293
14	+1	-1	+1	+1	-1	103.02	0.233
15	-1	+1	+1	+1	-1	79.33	0.335
16	+1	+1	+1	+1	-1	71.64	0.296
17	-1	-1	-1	-1	+1	0	0
18	+1	-1	-1	-1	+1	0	0
19*	-1	+1	-1	-1	+1	4.33 / 9.84	0.079 / 0.179
20*	+1	+1	-1	-1	+1	6.98 / 0	0.066 / 0
21	-1	-1	+1	-1	+1	7.19	0.025
22*	+1	-1	+1	-1	+1	0	0
23*	-1	+1	+1	-1	+1	19.43 / 47.99	0.262 / 0.278
24*	+1	+1	+1	-1	+1	24.36 / 0	0.298 / 0
25	-1	-1	-1	+1	+1	5.44	0.043
26	+1	-1	-1	+1	+1	8.95	0.035
27*	-1	+1	-1	+1	+1	24.12 / 13.44	0.170 / 0.19
28*	+1	+1	-1	+1	+1	16.86 / 1.95	0.231 / 0.193
29	-1	-1	+1	+1	+1	69.28	0.267
30	+1	-1	+1	+1	+1	89.27	0.235
31*	-1	+1	+1	+1	+1	61.98 / 37.58	0.298 / 0.236
32*	+1	+1	+1	+1	+1	20.27 / 51.28	0.301 / 0.307

*Experiments carried out in duplicate.

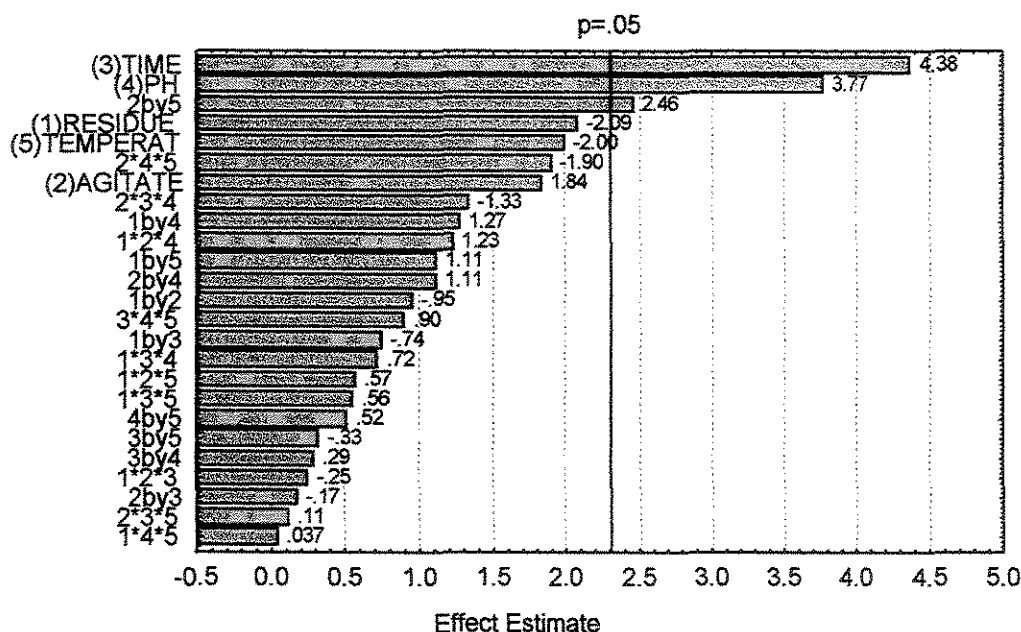


Fig. 2- Pareto chart of effects for the 2^5 experimental design for biomass production.

Little information is available in the scientific literature on complete optimization of fermentation parameters for xylanase production. The environmental parameters appear to have received smaller attention than culture medium in published studies. Most of the influence on the fermentation variables was studied by the traditional ‘one-factor-at-a time’ method. Environmental temperature will not only affect growth rates of an organism, but it can also have a marked effect on the levels of formed enzyme, as it was shown for *Penicillium janthinellum* P9 [22]. This fungus grew well in the temperature range 22-30°C with an optimum at 24°C and its chitinase activity showed the same behaviour, thus confirming Rapper and Thomm [23] previous reports on the thermal preferences of these species. Fig. 3 shows that highest xylanase production was obtained in the experiments where the *P. janthinellum* growth was larger.

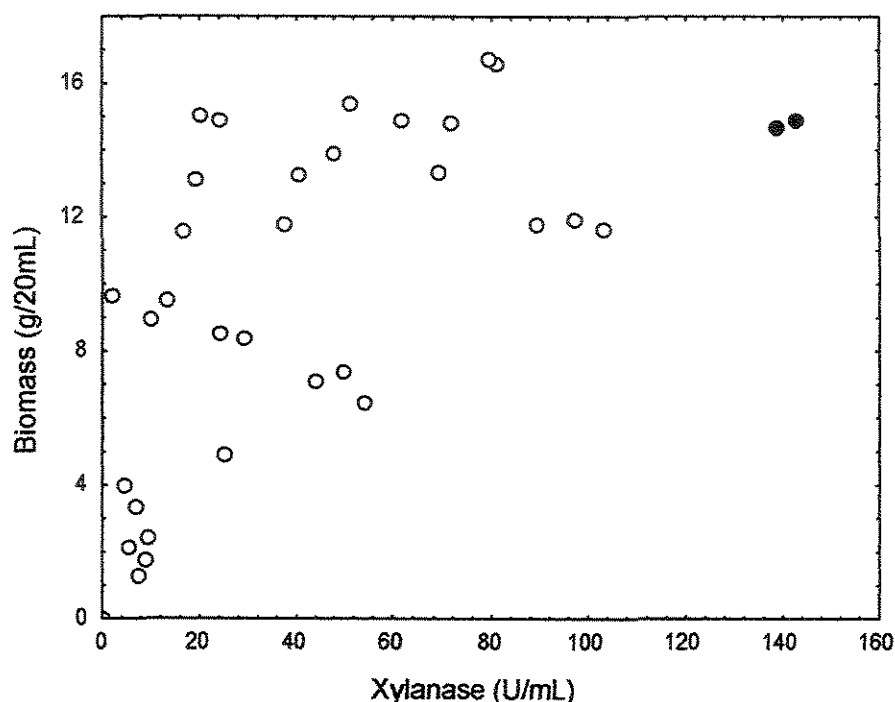


Fig. 3- Plot biomass versus xylanase activity. Full circles indicate the best assays.

The pH is an important environmental factor which significantly affects the production of xylanase. The experimental design employed here indicated that the enzyme production by *P. janthinellum* is influenced by initial pH in the 4.5-6.5 range. The optimum pH for xylanase production (16 U/mL) by *Penicillium funiculosum* was 5 in the pH range from 3 to 7 using cellulose powder and wheat bran [24]. Comparative studies showed an optimal pH of 4.0 (pH 3-6) for *Aspergillus sydowii* and at 30°C (20-40°C) for solid state fermentation on jute stalk [25].

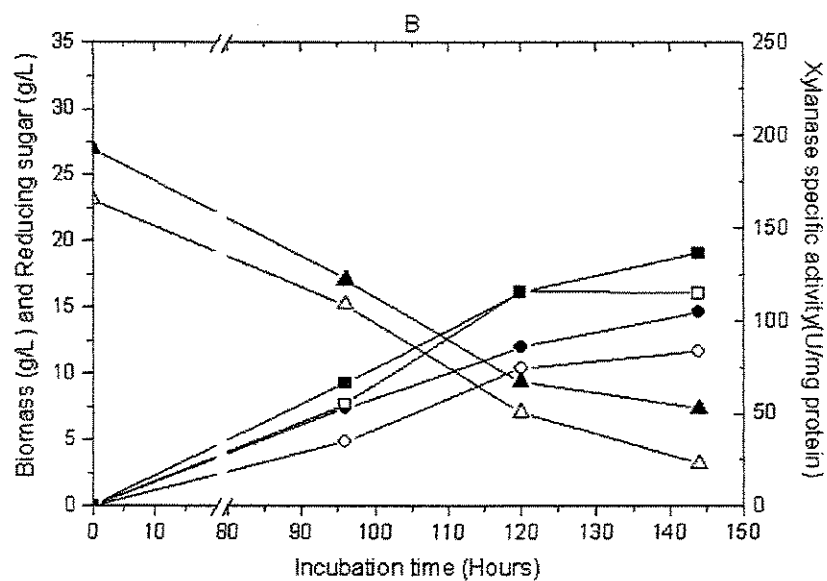
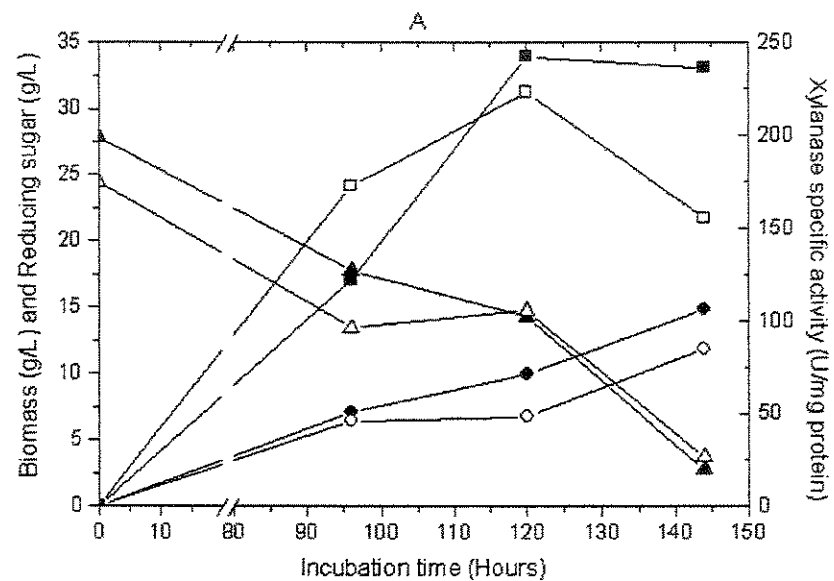
Cultivation of *P. janthinellum* indicated that 40 rpm was the best agitation rate for xylanase production (Fig. 1). The effects of shear stresses and mechanical forces on filamentous fungi, like change in morphology and breakage of hyphae, together with leakage of intracellular material due to agitation, have been described [26]. Similar adverse effects of the shear stress pertaining to the yields of xylanase were reported for *Thermomyces lanuginosus* in submerged and solid-state culture [10].

The choice of an appropriate substrate is of great importance for the successful production of xylanases. The substrate not only serves as a source of carbon and energy,

but also provides the necessary inducing compounds for the organism [26]. Of the two agricultural residues, oat husk were the best inducer of xylanase by *P. janthinellum* (Fig. 1). Dhillon et al. [27] related similar results. They found that oat husk was the most effective substrate for xylanase production by *Bacillus circulans*, when compared to corn cob.

The time course of cellular growth, reducing sugar and xylanase activity by *P. janthinellum* in oat husk and corn husk hydrolysates at 25°C is shown in Fig. 4. Enzyme production increased with time, although in Fig. 4A the specific xylanase activity was reduced. The enzyme amount increased following the biomass rise, which confirms that xylanase production by *P. janthinellum* is growth associated. The highest enzyme activity was achieved when reducing sugar concentration present in medium was very low. In some cases, readily metabolizable sugars are suppressors of xylanase synthesis [28].

Besides sugar, the hydrolyzate had high concentrations of acetic acid, furfural and hydroxymethyl-furfural. These compounds, present in this type of hydrolyzate, act as inhibitors of microbial growth. Pessoa et al. [29] observed that *Candida tropicalis* growth was not inhibited by furfural and hydroxymethyl-furfural. According to the literature [30] furfural can be assimilated by yeasts or fungi. Acetic acid is the most studied inhibitor. Its inhibitory action depends on the concentration of the undissociated form. At acidic pH the acetic acid can diffuse into cell cytoplasm, where it dissociates and lowers the intracellular pH. As a result, the proton gradient across the membrane can not be maintained, energy production is uncoupled and the transport of various nutrients is impaired [31]. This inhibitory effect of acetic acid could explain why at pH 4.5 *P. janthinellum* did not grow in corn cob (Fig. 4D and Table 1), although the initial pH after sterilization and salt solution addition was 4.6 and 5.1 and not 4.5 and 6.5. This study demonstrated the advantages of using experimental designs for increasing enzyme production by *P. janthinellum*. The cultivation time had the most important effect on cellular growth and xylanase production. The best xylanase production value (142.85 U/mL) represented a 2.58 fold increase compared to that obtained previously.



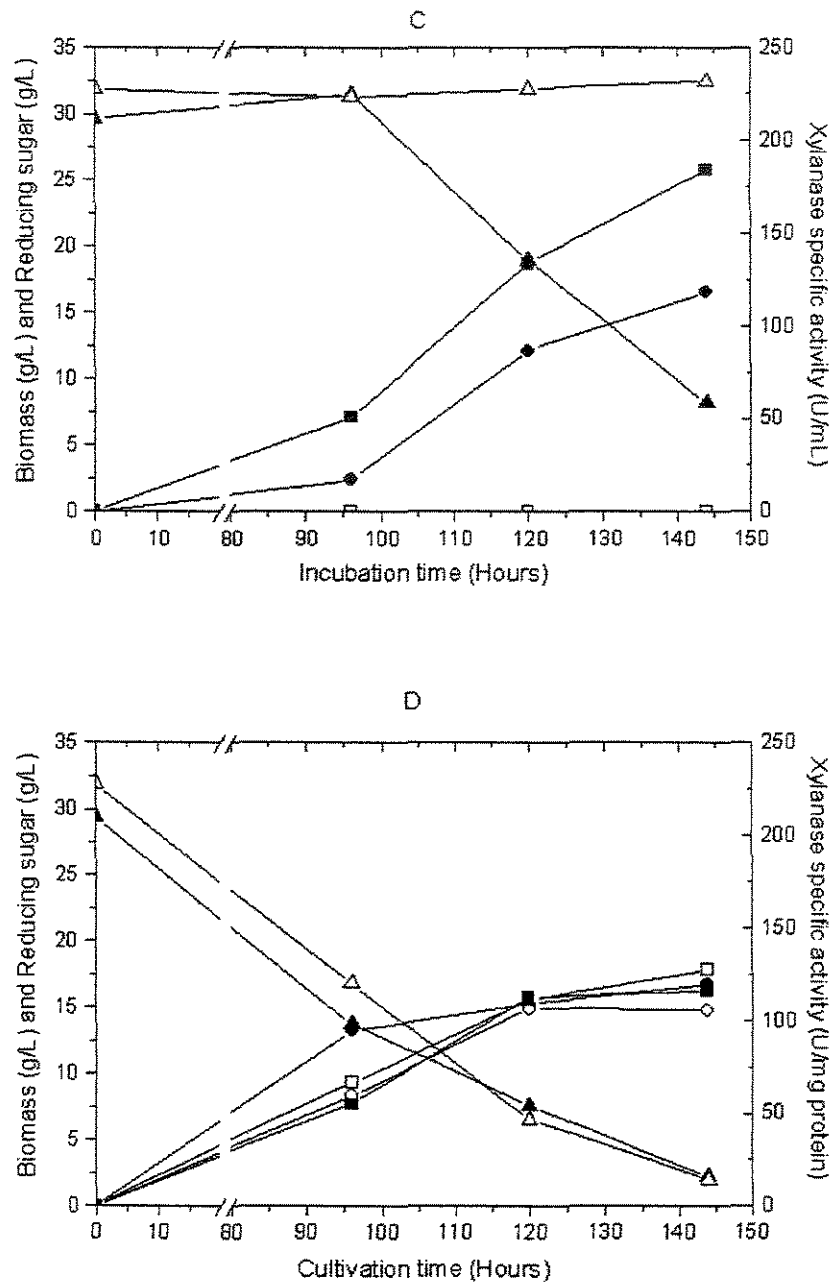


Fig. 4- Production of xylanase using 40 rpm with residue hydrolysate pH 4.5 (A) and 6.5 (B) or 80 rpm with residue hydrolysate pH 4.5 (C) and 6.5 (D). Xylanase (□), biomass (○) and reducing sugar (△) are plotted as filled symbols (oat husk) or empty symbols (corn husk).

4. Acknowledgements

We would like to thank L. Ferenczi Ind Com LTDA for the oat husk samples. Luciana A. Oliveira acknowledges receipt of a research fellowship from CNPq (Brasil).

5. References

- [1] Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Freitas, R.J.S., Christen, P. and Soccol, C.R. (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, 6, 33-39.
- [2] Karni, M., Deopurkar, R.L. and Rale, V.B. (1993) β -xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 476-478.
- [3] Ferreira, G., Boer, C.G. and Peralta, R.M. (1999) Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamari* in solid state fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 173, 335-339.
- [4] Subramaniyan, S. and Prema, P. (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22, 33-64.
- [5] Ghanem, N.B., Yusef, H.H. and Mahrouse, H.K. (2000) Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Biores. Technol.*, 73, 113-121.
- [6] Biely, P. (1995) Microbial xylanolytic enzymes. *Trends Biotechnol.*, 11, 286-290.
- [7] Haltrich, D., Preiss, M. and Steiner, W. (1993) Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 854-860.
- [8] Haltrich, D., Laussamayer, B., Steiner, W., Nidetzky, B. and Kulbe, K.D. (1994) Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of *Sclerotium rolfsii* – optimization of the

- culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Biores. Technol.*, 50, 43-50.
- [9] Souza, M.C.O., Roberto, I.C. and Milagres, A.M.F. (1999) Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 768-772.
- [10] Purkarthofer, H., Sinner, M. and Steiner, W. (1993) Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 677-682.
- [11] Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.R., Gomes, E. and Silva, R. (2002) Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochem.*, 38, 727-731.
- [12] Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. (2002) Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. *Biochem. Eng. J.*, 12, 99-105.
- [13] Barros Neto, B., Scarminio, I.S. and Bruns, R.E. (2001) Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 401 pp, 1st Ed, UNICAMP, Brazil.
- [14] Milagres, A.M.F. (1988) Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*. Tese de Mestrado, UFV, Viçosa.
- [15] Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microb. Gen. Bull.*, 13, 42-43.
- [16] Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. (1992) Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, 23, 257-270.
- [17] Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- [18] Sedmak, J.J. and Grossberg, S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*, 79, 544-522.
- [19] Statistica for windows version 5 (Statsoft, UK).

- [20] Milagres, A.M.F. and Duran, N. (1992) Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulps. *Progress Biotechnol.*, 7, 539-545.
- [21] Palma, M.B., Milagres, A.M.F., Prata, A.M.R. and Mancilha, I.M. (1996) Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochem.*, 31, 141-145.
- [22] Fenice, M., Leuba, J.L. and Federich, F. (1998) Chitinolytic enzyme activity of *Penicillium janthinellum* P9 in bench-top bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 620-623.
- [23] Rapper, K.R. and Thomm, C. (1968) *Manual of Pennicillia*, Afner Publication Co. NY and London.
- [24] Mishra, C., Seeta, R. and Rao, M. (1985) Production of xylanolytic enzymes in association with the cellulolytic activities of *Penicillium funiculosum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 295-299.
- [25] Ghosh, M. and Nanda, G. (1993) High activity xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49 during growth on jute stalk lignocellulose. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17, 68-71.
- [26] Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W. and Zupancic, S. (1996) Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.*, 58, 137-161.
- [27] Dhillon, A., Gupta, J.K., Jauhari, B.M. and Khanna, S. (2000) A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Biores. Technol.*, 73, 273-277.
- [28] Souza, D.F., Souza, C.G.M. and Peralta, R.M. (2001) Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarri* in solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 36, 835-838.
- [29] Pessoa Jr, A., Mancilha, I.M. and Sato, S. (1996) Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *J. Biotechnol.*, 51, 83-88.

- [30] Silva, J.B.A., Mancilha, I.M., Vannetti, M.C.D. and Teixeira, M.A. (1995) Microbial protein production by *Paecilomyces variotti* cultivated in Eucaliptus hemicellulosic hydrolyzate. *Biores. Technol.*, 52, 197-200.
- [31] Parajó, J.C., Domínguez, H. and Domínguez, J.M. (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Biores. Technol.*, 66, 25-40.

Capítulo 4

Neste capítulo foi estudada a fermentação extrativa da xilanase produzida por *P. janthinellum* no sistema PEG/polissacarídeo da goma do cajueiro. Foram avaliados os parâmetros: agitação, pH inicial, tempo de cultivo, temperatura, resíduo agroindustrial e composição do SDFA. Os fatores mais importantes para a produção da enzima foram a agitação e o tempo de cultivo. No sistema PEG 8000/goma obteve-se os maiores valores de atividade específica da xilanase, bem como a concentração da enzima na fase superior (160, 7 U/mL) e seu rendimento (97%).

O trabalho foi submetido para a publicação no periódico Journal of Biotechnology.

Xylanase production by *Penicillium janthinellum* in aqueous two-phase systems

Luciana A. Oliveira^{1,2*}, Benício Barros Neto³, Ana L. F. Porto^{2,4}, Elias B. Tambourgi¹

1- Departamento de Sistemas Químicos e de Informática – UNICAMP

2- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Campus Universitário, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: o_luciana@hotmail.com

3- Departamento de Química Fundamental – UFPE

4- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Abstract

Cultivation of the fungus *Penicillium janthinellum* for xylanase production was studied in a polyethylene glycol/cashew-nut tree gum aqueous two-phase system, using a two-level fractional factorial design. The parameters studied were initial pH, cultivation time, agro-industrial residue, agitation, temperature and composition of aqueous two-phase system. The xylanase produced during fermentation partitioned into the upper phase. The agitation, cultivation time, temperature and initial pH effects proved statistically significant for xylanase production. The highest xylanase production in the upper phase and its yield, about 160.7 U/mL and 97%, were obtained in cultures of 120 hours.

Keywords: Aqueous two-phase system; Cashew-nut tree gum; Extractive cultivation; Xylanase; *Penicillium janthinellum*; Experimental design

1. Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPS) are formed when water solutions of two different polymers or one polymer and one salt are mixed because of their incompatibilities. These systems are usually biocompatible because of the high water content of both phases, and possess partition properties favorable to their application in large-scale enzyme separation and purification and extractive bioconversion. Extractive fermentation using ATPS seems especially suitable for integration of fermentation and downstream processing in cultures where extracellular products are obtained (Albertsson, 1986). The application of ATPS is feasible when the presence of substrates or products limits the extent of bioconversion; biocatalysts are partitioned separately from substrates or products in such systems. ATPS form a relatively mild environment for cells, as compared to water/organic solvent two-phase systems. They are, furthermore, suitable for extraction of biomolecules (Sinha et al., 2000).

A number of extractive fermentation processes in aqueous two-phase systems has been reported so far. Examples include production of β -glucosidase by *Aspergillus phoenicis* (Persson et al., 1989), alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* (Hotha and Banik, 1997), β -galactosidase by *Escherichia coli* (Kuboi et al., 1995), chitinase from *Serratia marcescens* (Chen and Lee, 1995) and pectinase by *Polyporus squamosus* (Antov et al., 2001).

The most common systems are polyethylene glycol (PEG)/dextran and PEG/salt. The properties of these systems are well studied but high cost of fractionated dextran prevents their use in large-scale processes (Christian et al., 1998). These problems may be overcome by using PEG/salt systems. However, a high concentration of salts has been found to be toxic to microbial cells (Sinha et al., 2000).

The utilization of polysaccharides and their derivatives, which provides a reduction in total production cost of an aqueous phase extraction, may have a large impact in the development of two-phase systems for large-scale purification. A number of low-cost alternatives have been investigated, including cellulose derivatives (Skuse et al., 1992), starch derivatives (Venâncio et al., 1993) and arabinogalactan (Christian et al., 1998).

The gum exudate from *Anarcadium occidentale* L., the cashew-nut tree gum largely found in Brazil is a branched acidic heteropolysaccharide, that has been recently reported as a suitable alternative to fractioned dextran (Oliveira et al., 2002a; Sarubbo et al. 2000). This work reports on a study of the application of the PEG/cashew-nut tree gum aqueous two-phase system to the extractive cultivation process. The production of xylanase from *Penicillium janthinellum* is employed as a case study. The effect of phase forming polymers, agro-industrial residue, agitation, pH, temperature and incubation time, all of which can affect xylanase production by *P. janthinellum*, were examined.

2. Materials and Methods

2.1. Polymers

Polyethylene glycol (PEG) 4000 and PEG 8000 were obtained from Carbowax and Sigma, respectively. Crude-nut gum was collected as natural exudates from cultivated *Anarcadium occidentale* trees (common yellow type) in various localities in Pernambuco, Brazil. The polysaccharide was isolated via ethanol precipitation, as previously described (Rodrigues et al., 1993). Precipitation with ethanol allowed the isolation of the polysaccharide from the monosaccharides and oligosaccharides, which remained in solution.

2.2. Microorganism

The isolation of the microorganism *P. janthinellum* from decaying wood was described by Milagres (1988). It was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection with the designation CRC 87M-115.

2.3. Preparation of agro-industrial residue acid hydrolysate

800 g of dry milled lignocellulosic materials (corn cob and oat husk) was mixed with 8 L of sulphuric acid solution (0.25%) and sterilized for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 4.5 or 6.5 with NaOH 1M (Table

1). Corn cob was collected in various localities in Venturosa, Pernambuco State, Brazil. Oat husk samples were provided by L. Ferenczi Ind Com LTDA (São Paulo, Brazil).

2.4. Growth conditions and enzyme production

The fungus was cultivated at 30°C for 5 days in a medium containing 1% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated complete salt solution based on Vogel's medium (1956) and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. To obtain the spore inocula, spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed on Erlenmeyer flasks. The final spore concentration was 10^6 mL^{-1} . The medium for controlling homogeneous cultivation consisted of the above residue hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium (1956) and 0.1% yeast extract. ATPS medium contained 9% w/w PEG4000 / 18% w/w cashew-nut tree gum or 9% w/w PEG8000 / 16% w/w cashew-nut tree gum, in addition. The aqueous two-phase fermentation medium was prepared from stock solution of 25% cashew-nut tree gum in residue hydrolysate and by dissolving powdered PEG. Salts and yeast extract were sterilized separately. The medium was then sterilized for 15 min at 121°C. Cultivation was carried out in 60 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL medium. The influence of the process parameters on cellular growth and xylanase production by *P. janthinellum* was assessed with a 2^{6-1} fractional factorial design. Table 1 shows the levels of the variables chosen for this study.

Table 1- Levels of independent variables in the 2^{6-1} factorial design.

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Agro-industrial residue	Oat husk	-	Corn cob
Aqueous two-phase system	PEG 4000	-	PEG 8000
Agitation (rpm)	40	60	80
Cultivation time (Hours)	96	120	144
Residue hydrolysate pH	4.5	5.5	6.5
Temperature (°C)	25	27.5	30

2.5. Enzyme activity and protein determination

Extracellular xylanase activity was determined by incubating 0.1 mL diluted culture filtrate with 0.9 mL of a 'Birchwood' xylan suspension (10.0 g/L) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C following Bailey et al. (1992). The reducing equivalents released were measured by a colorimetric assay (Miller, 1959) using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per minute at 50°C. The amount of total protein was determined according to the Coomassie Blue method described by Sedmak and Grossberg (1977) using bovine serum albumin as a protein concentration standard. Enzyme activity and protein were determined in both phases. The partition coefficient, K , is defined as the enzyme concentration ratio between top and bottom phases. The phase volumes were measured in a graduated cylinder. The percentage yield of the enzyme in the top, Y is given by Eq. (1):

$$Y = \frac{100}{1 + \frac{1}{V_r} + \frac{1}{K}} \quad (1)$$

where V_r is the volume ratio between top and bottom phases and K is the partition coefficient of the enzyme.

2.6. Microbial growth

Microbial growth was estimated from biomass dry weight.

3. Results and discussion

Polymers and salts used to generate two-phase systems can account for as much as 75% of the total production cost of an aqueous-phase extraction (Venâncio et al., 1993). For industrial purposes, the ideal systems should have a shorter phase separation time, a lower viscosity and little cost. The PEG/cashew-nut tree gum system is a suitable alternative to PEG/fractionated dextran, because the gum is cheap, and the system presents a short phase separation time. The PEG/gum system with the lower viscosity, among those

evaluated, was used in this study. In this system, the top phase is rich in PEG while the bottom phase is rich in gum (Oliveira et al., 2002b).

Table 2 shows the result obtained in the 2^{6-1} design. In a typical extractive fermentation, the cells partition to one phase, usually the bottom phase. In this work, however, fungus growth was mycelar and the *P. janthinellum* cells grew under the top phase. This fact might be due to the low agitation rate and to the higher viscosity of the ATPS. The xylanase produced partitioned mainly to the upper phase. To determine the significant factors, taking as the response the enzyme concentration in the top phase, we used the Pareto chart, a useful tool for identifying which estimated effects are the most important (Barros Neto et al., 2001). The Pareto chart of the effects for xylanase production is shown in Fig. 1. Four parameters are statistically significant for xylanase production. Agitation is the most important (with negative effect), followed by cultivation time (with a positive effect). The effects of the ATPS and agro-industrial residue hydrolysates were indistinguishable from error. Therefore, xylanase production in the top phase is enhanced when the fermentation is carried out at 25°C, 40 rpm, pH6.5 and 144h.

Shear stresses and mechanical forces effects on filamentous fungi have been described (Haltrich et al., 1996). Similar adverse effects of the shear stress pertaining to the yield of xylanase were found in this work. The xylanase production by *P. janthinellum* in the reference system without polymers has been examined (unpublished results). In the reference system, the agro-industrial residue was also found to be significant for xylanase synthesis. Nevertheless, the cultivation time had the most important effect on enzyme production followed by temperature.

P. janthinellum did not grow in most ATPS at pH 4.5 (Table 2), although the initial pH after sterilization and salt solution addition was 4.6 and 5.0, not 4.5 and 6.5. This could be due to the inhibitory effect of the acetic acid formed during the agro-industrial residue hydrolysis. The acetic acid inhibitory action depends on the concentration of the undissociated form (Parajó et al., 1998).

Table 2- Results of the 2⁶⁻¹ factorial designs

	PH	ATPS	Time	Residue	Agitate	Temperature	Xylanase (U/mL) ¹	K
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)		
1*	-1	-1	-1	-1	-1	-1	56.44 / 38.78	10.55 / 9.58
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	61.04	9.41
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	0	-
4*	+1	+1	-1	-1	-1	-1	70.62 / 30.39	5.81 / 8.76
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0	-
6*	+1	-1	+1	-1	-1	-1	176.13 / 162.24	4.95 / 6.60
7*	-1	+1	+1	-1	-1	-1	174.69 / 171.21	12.58 / 12.33
8	+1	+1	+1	-1	-1	+1	101.97	18.17
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	0	-
10*	+1	-1	-1	+1	-1	-1	42.04 / 68.97	9.34 / 11.63
11*	-1	+1	-1	+1	-1	-1	8.86 / 38.19	2.04 / 10.21
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	33.68	8.00
13*	-1	-1	+1	+1	-1	-1	175.65 / 155.08	30.76 / 14.63
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	144.52	7.27
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0	-
16*	+1	+1	+1	+1	-1	-1	160.93 / 135.44	11.91 / 6.79
17*	-1	-1	-1	-1	+1	+1	0 / 0	-
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1	7.89	4.33
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0	-
20*	+1	+1	-1	-1	+1	+1	4.17 / 3.33	0.47 / 2.19
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1	0	-
22*	+1	-1	+1	-1	+1	+1	10.64 / 20.95	1.27 / 3.60
23*	-1	+1	+1	-1	+1	+1	0 / 0	-
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1	18.82	1.43
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1	0	-
26*	+1	-1	-1	+1	+1	+1	10.90 / 4.46	1.78 / 5.31
27*	-1	+1	-1	+1	+1	+1	5.62 / 0	2.20 / -
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1	7.08	1.40
29*	-1	-1	+1	+1	+1	+1	29.81 / 0	1.88 / -
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1	31.97	0.88
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0	-
32*	+1	+1	+1	+1	+1	+1	28.79 / 38.17	2.82 / 0.88

*Experiments carried out in duplicate. ¹ Xylanase activity in upper phase.

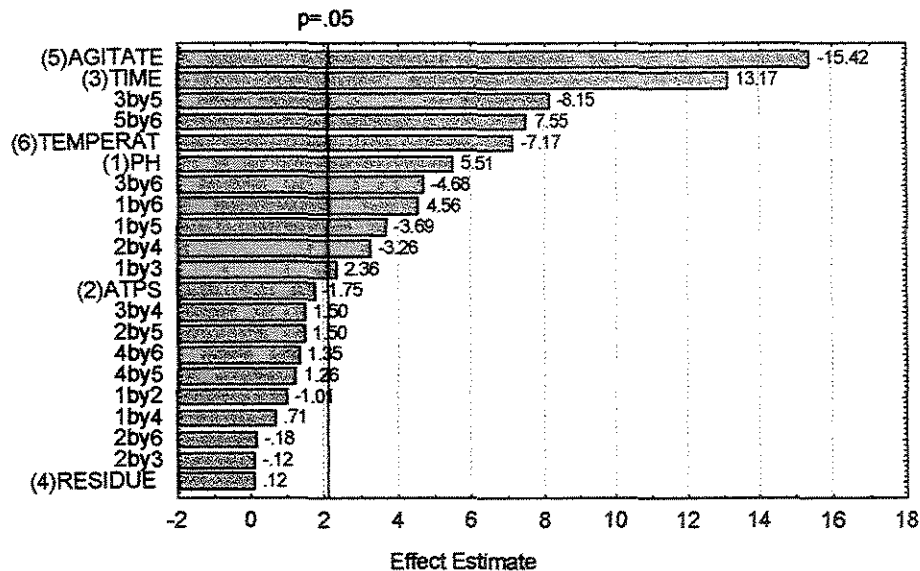


Fig. 1- Pareto chart of effects for xylanase production by *P. janthinellum*. The vertical line marks the 95% significance limit.

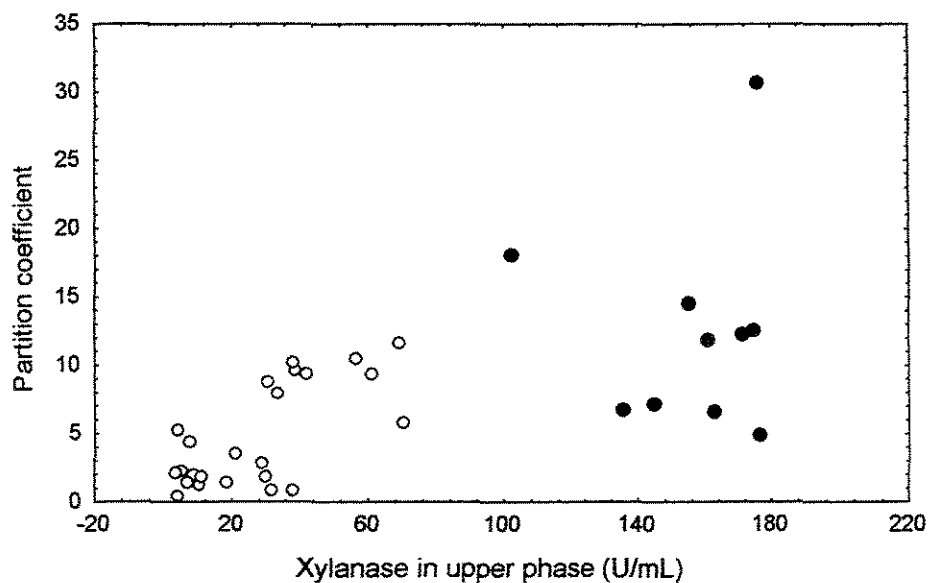


Fig. 2- Partition coefficient versus xylanase activity in upper phase. Full circles indicate the best assays

In biotechnological processes the productivity might not be the most important factor determining the effectiveness of the process. Of much greater importance might be the final product concentrations. If improved productivity is gained at the expense of a

dilute product stream, the cost of concentrating the product may be the limiting factor in overall process economics. In this extractive fermentation with PEG/ gum systems, the highest xylanase productions correspond to the highest partition coefficient, as can be seen in Fig. 2. These fermentations were carried out at 25°C, 40 rpm, pH 6.5 and 144 h.

Figs. 3a, b and c show respectively: cell growth, xylanase production by *P. janthinellum* and specific xylanase activity in the reference system without polymers and in the ATPS at 25°C, 40 rpm and pH 6.5. Cell growth is similar in all ATPS (Fig. 3a). Compared to the reference system, cell concentration increased by a factor of 1.6 (oat husk) and 1.8 (corn cob) in the media containing PEG 8000/gum and PEG4000/gum, respectively. The enzyme production kinetics was similar in both systems, but the enzyme concentration in ATPS was higher than that in reference system (Fig. 3b). Maximum enzyme activities of 169.2 U/mL for oat husk and 170.5 U/mL for corn cob in PEG 4000/gum ATPS were respectively 1.7 and 1.2 times higher than the activity in the reference system. Cell growth and enzyme production were also faster in the ATPS than in the control system. Similar results were reported by Antov et al. (2001) in an ATPS composed of PEG 4000 and crude dextran with the fungus *Polyporus squamosus*, for pectinase production. The studies on β -glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* showed an increase in enzyme yield of 32.5% in a PEG 1550/dextran ATPS over the control medium (Persson et al., 1989).

Specific xylanase activity in the ATPS was higher than in the reference system (Fig. 3c), and the highest specific activity was observed with PEG 8000. Protein partition in ATPS is a very complex phenomenon and depends on various factors such as ionic composition, pH, size of protein molecules and concentration and molecular weight of the two-phase-forming polymers (Albertsson, 1986). During the cultivation of *P. janthinellum* changes occurred in the medium components and pH, as well as, the production of various metabolites that might affect xylanase partition. During fermentation, the volume ratio for the PEG/gum systems had a tendency to decrease, while the pH value increased (Table 3). The PEG 8000/gum system had higher volume ratio values than PEG4000/gum. Since the volume ratio should be large to increase the top phase yield, the PEG 8000/gum system using oat husk hydrolysate gave the highest yield, with partition coefficient and phase volume ratio of 18.72 and 1.73, respectively (Table 3). This system also had the highest specific xylanase activity on the 5th cultivation day (Fig. 3c).

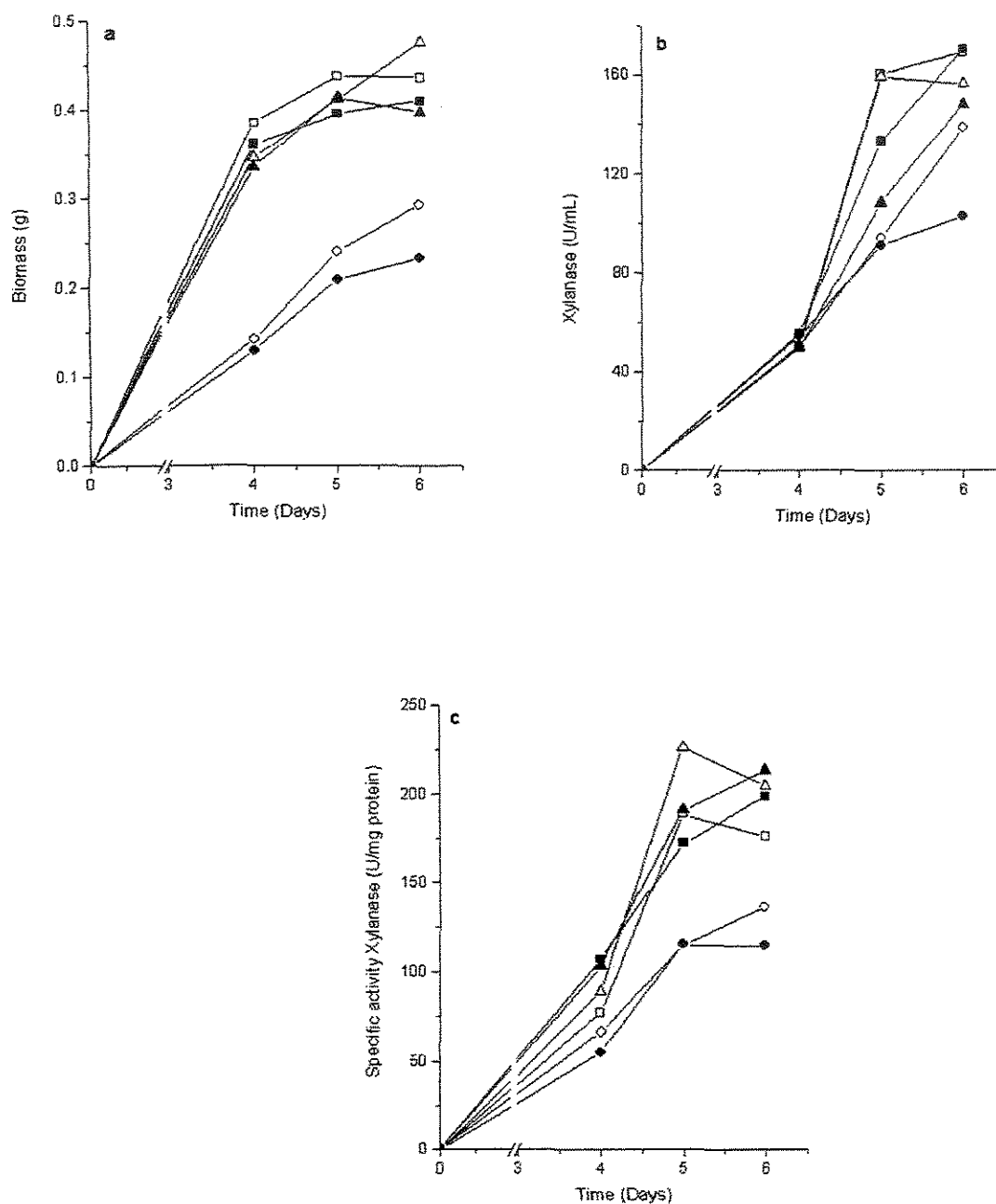


Fig. 3- Time course of *P. janthinellum* cultivation in ATPS and reference system. (a) biomass, (b) xylanase and (c) specific xylanase activity. Fermentation was carried out at 40 rpm, 25°C and pH 6.5, using corn cob (filled symbol) and oat husk (empty symbol). Conventional fermentation (O), PEG 4000/gum (□) and PEG 8000/gum (Δ). Each experiment was repeated two times.

Table 3. Production of xylanase by *P. janthinellum* at 25°C and 40 rpm in aqueous two-phase systems PEG/gum and conventional medium

Time (Day)		PEG 4000				Control		
						Sugar		
Oat husk	K	V _r	Y	pH	Upper	Bottom	pH	Sugar
0	-	1.51	-	5.03	19.88	27.33	4.95	26.95
4	8.15	1.44	92.15	5.14	9.94	24.39	5.42	17.10
5	10.58	1.51	94.11	6.15	5.75	18.69	6.53	9.37
6	5.77	1.43	89.19	6.75	4.88	17.93	6.95	7.37
Corn cob								
0	-	1.51	-	4.98	18.81	24.38	5.06	23.11
4	10.49	1.56	94.24	5.27	7.83	20.74	5.02	15.24
5	15.60	1.49	95.88	5.95	5.67	15.85	6.58	7.10
6	10.97	1.45	94.09	6.5	3.59	14.68	7.14	3.24
PEG 8000								
Oat husk								
0	-	2.00	-	5.00	19.64	26.38		
4	7.28	1.96	93.45	5.18	9.62	25.31		
5	18.72	1.73	97.00	6.30	5.05	19.34		
6	10.22	1.61	94.27	6.70	4.65	16.30		
Corn cob								
0	-	2.20	-	7.97	18.31	23.58		
4	11.56	2.19	96.20	5.27	6.90	20.62		
5	13.19	1.82	96.00	5.94	6.11	16.29		
6	9.35	1.73	94.18	6.54	3.42	12.85		

Each value represents a mean of two repeats.

The increase of enzyme concentration achieved in the present investigation could be due to the higher mycelial growth in ATPS (Fig. 3a) and to partition of reducing sugars to the bottom phase (Table 3), because the excess readily metabolizable sugars are suppressors of xylanase synthesis (Haltrich et al., 1996). Similar results were obtained for extractive fermentation of chitinase by *Serratia marcescens* carried out in PEG 2000/dextran system (Chen and Lee, 1995). This enzyme's activity in the ATPS was 3.1 times higher than in regular medium. The increase in chitinase production was the result of maintaining the inhibitory metabolite, N-acetylglucosamine, at a low concentration by removing it from the upper phase where the microorganism grown (Chen and Lee, 1995).

Recently, partitioning of xylanase produced by *P. janthinellum* (Costa et al., 2000) and *Bacillus pumilus* (Bim and Franco, 2000) in PEG/phosphate ATPS was reported. In these works the enzyme accumulated in the top phase. An extractive cultivation of recombinant *Escherichia coli* cells to produce xylanase using PEG/phosphate was developed by Kulkarni et al. (1999). These authors obtained partition coefficient and xylanase recovery in the top phase of approximately 3.6 and 85%, respectively.

In this work a very promising aqueous two-phase system was developed in which higher xylanase and biomass were produced, when compared to reference system. The partition coefficient and xylanase recovery in the top phase were 18.7 and 97 %, respectively. This system could be an alternative to PEG/dextran systems. Further investigation, however, it is need confirm its usefulness.

4. Acknowledgements

We would like to thank L. Ferenczi Ind Com LTDA for the oat husk samples. Luciana A. Oliveira acknowledges receipt of a research fellowship from CNPq (Brazil).

References

- Albertsson, P.A. (1986) Partition of cell particles and macromolecules. 3rd ed., Willey Interscience, New York.
- Antov, M.G., Pericin, D.M., Dimic, G.R. (2001) Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. J. Biotechnol., 91, 83-87.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. (1992) Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol., 23, 257-270.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. (2001) Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na Indústria, 1st Edition, UNICAMP.
- Bim, M.A., Franco, T.T. (2000) Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. J. Chromatogr. B, 743, 349-356.
- Chen, J.P., Lee, M.S. (1995) Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. Enzyme Microb. Technol., 17, 1021-1027.
- Christian, T.J., Manley-Harris, M., Richards, G.N. (1998) A preliminary study of the use of larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems. Carbohydr. Polym., 35, 7-12.
- Costa, S.A., Pessoa Jr, A., Roberto, I.C. (2000) Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. J. Chromatogr. B, 743, 339-348.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., Zupancic, S. (1996) Production of fungal xylanases. Biores. Technol., 58, 137-161.
- Hotha, S., Banik, R.M. (1997) Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems. J. Chem. Tech. Biotechnol., 69, 5-10.
- Kuboi, R., Umakoshi, H., Komazawa, I. (1995) Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly (ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system to produce intracellular β -galactosidase. Biotechnol. Prog., 11, 202-207.

- Kulkarni, N., Vaidya, A., Rao, M. (1999) Extractive cultivation of recombinant *Escherichia coli* using aqueous two phase systems for production and separation of extracellular xylanase. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 255, 274-278.
- Milagres, A.M.F. Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*. Viçosa: Tese de Mestrado, UFV, 1988.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Oliveira, L.A., Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., Tambourgi, E.B. (2002a) Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. *Process Biochem.*, 38, 693-699.
- Oliveira, L.A., Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Lima-Filho, J.L., Campos-Takaki, G.M., Tambourgi, E.B. (2002b) Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, 766, 27-36.
- Parajó, J.C., Domínguez, H., Domínguez, J.M. (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Biores. Technol.*, 66, 25-40.
- Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hagerdal, B. (1989) Production of β -glucosidase by *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Tech.*, 3, 265-270.
- Rodrigues J.F., Paula, R.C.M., Costa, S.M. (1993) Polímeros: ciência e tecnologia, ano III, 31-36.
- Sarubbo, L.A., Oliveira, L.A., Porto, A.L.F., Duarte, H.S., Carneiro-Leão, A.M.A., Lima-Filho, J.L., Campos-Takaki, G.M., Tambourgi, E.B. (2000) New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. *J. Chromatogr. B*, 743, 79-84.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*, 79, 544-522.
- Sinha, J., Dey, P.K., Panda, T. (2000) Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 476-486.

Skuse, D.R., Norris-Jones, R., Yalpani, M., Brooks, D.E. (1992) Hydroxypropyl cellulose/poly (ethylene glycol)-co-poly (propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins. *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 785-790.

Venâncio, A., Teixeira, J.A., Mota, M. (1993) Evaluation of crude hydroxypropyl starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer. *Biotechnol. Prog.*, 9, 635-638.

Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microb. Gen. Bull.*, 13, 42-43.

CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- O sabugo de milho e a casca de aveia hidrolisados, dentre os cinco resíduos estudados, foram os melhores indutores da produção de xilanase (55 U/mL) pelo *P. janthinellum*. A produção da xilanase foi associada ao crescimento do fungo, nos quatro resíduos onde houve produção da enzima. As maiores produções de biomassa foram obtidas com a casca de mandioca e casca de grão de milho.
- Todos os fatores estudados foram significativos para a produção de xilanase pelo *P. janthinellum* na fermentação convencional. O tempo de fermentação e a temperatura foram as variáveis mais importantes, seguidas pelo pH inicial do meio, agitação e resíduo agro-industrial. A maior produção de xilanase foi obtida com a aveia, a 25°C e 144 horas (142.85 U/mL). Para a produção de biomassa na fermentação convencional, apenas o tempo de fermentação e o pH inicial foram significativos.
- Para a fermentação extrativa, os fatores mais importantes foram a agitação e o tempo de cultivo, seguidos pela temperatura e pH inicial do meio. Os valores dos efeitos do sistema de duas fases aquosas e do resíduo agroindustrial ficaram dentro da variação do erro experimental. A xilanase produzida concentrou-se na fase superior e o crescimento do fungo foi na superfície desta.
- Os maiores valores da produção de xilanase e rendimento na fase superior foram 160,7 U/mL e 97% no sistema PEG8000/polissacarídeo da goma do cajueiro. Neste sistema obteve-se também um maior valor de atividade específica para a xilanase, portanto, uma maior pré-purificação. A maior produção da enzima no SDFA foi obtida um dia antes em relação à fermentação no meio controle.