



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTA DA BAHIA - UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOBRE A CASCA DE ARROZ E A
CASCA DE AMENDOIM.

AILA RIANY DE BRITO

ITAPETINGA – BAHIA
FEBREVEIRO DE 2015

AILA RIANY DE BRITO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTIAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOBRE A CASCA DE ARROZ E A
CASCA DE AMENDOIM.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. *DSc.* Marcelo Franco

Co-orientadora: Prof^a. *DSc.* Renata C. F. Bonomo

Co-orientadora: Prof^a. *DSc.* Ana Paula T. Uetanabaro

**ITAPETINGA – BA
FEVEIRO DE 2015**

661.807 Brito, Aila Riany de
P875o Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim. / Aila Riany de Brito. - Itapetinga: UESB, 2015.
102f.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Mestre. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e co-orientação da Prof^ª. D.Sc. Renata C. F. Bonomo e Prof^ª. D.Sc. Ana Paula T. Uetanabaro.

1. Casca de arroz e a casca de amendoim - Condições de reação enzimática.
2. Bioconversão fúngica - Fungos filamentosos. 3. Fermentação no estado sólido.
I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Bonomo, Renata C. F.. IV. Uetanabaro, Ana Paula T.. V. Título.

CDD(21): 661.807

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Casca de arroz e a casca de amendoim - Condições de reação enzimática
2. Bioconversão fúngica - Fungos filamentosos
3. Fermentação no estado sólido



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOBRE A CASCA DE ARROZ E A CASCA DE AMENDOIM.

Autor (a): AILA RIANY DE BRITO

Orientador (a): Prof.^o Dr. Marcelo Franco

Co-Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
Prof.^a Dr.^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Ana Paula T. Uetanabaro

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro (UESC)

João Carlos T. Dias

Prof.^o Dr. João Carlos Teixeira Dias (UESC)

Mateus Gomes de Godoy

Prof.^o Dr. Mateus Gomes de Godoy (UFRJ)

Itapetinga-BA, 23 de fevereiro de 2015.

*A Deus, fonte de vida e de infinita
bondade e sabedoria.*

*A minha família, que é a maior benção da
minha vida, pelo exemplo de amor, pelos
ensinamentos, pela confiança, por me
apoiarem, dedico a vocês esta conquista,
esta vitória com infinita gratidão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo olhar atento e cuidadoso em todos os momentos e por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa da minha existência com sucesso.

Aos meus pais Arlindo Brito (*in memoriam*), Maria de Lourdes e Célia Rozemar, pelo amor, dedicação e por todo o incentivo e confiança depositados em todos os meus sonhos.

Ao meu marido Manuel Carlos pelo companheirismo, apoio, carinho e paciência demonstrado em todos os momentos da nossa convivência.

Aos meus companheiros e amigos adquiridos ao longo dessa caminhada, Nadabe Reis, Adejanildo Pereira, Lívia Freitas, Thamyres Prado, Ludmila Mascarenhas, Nátilla Deyse, Rafael Costa, Tamires Carvalho, Grazielle Silva, Ben Hur Gonçalves, pela força, pelo carinho, apoio e troca de conhecimentos em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório de microbiologia da agroindústria da UESC, Polyane Novais, Elck Carvalho, Laís Vieira, Nícolle Paiva pelos ensinamentos, pela diversão e apoio constantes.

Ao meu orientador Marcelo Franco pela oportunidade concedida, orientação, cordialidade com que sempre me recebeu, pela aprendizagem, pela confiança e principalmente pelo meu crescimento profissional.

As minhas co-orientadoras Renata Cristina F. Bonomo e Ana Paula T. Uetanabaro, pela orientação, auxílio e concretização desse projeto.

A todos os meus professores da pós-graduação pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

A UESB e ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

A UESC pela infraestrutura e excelente ambiente de trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite.

BRITO, A. R. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOBRE A CASCA DE ARROZ E A CASCA DE AMENDOIM. Itapetinga-BA: UESB, 2015. 97 p. (Dissertação: Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos – Área de Concentração em Ciência dos Alimentos).

RESUMO

A produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) é influenciada por diversos fatores como tipo de micro-organismo, biomassa residual e também pelas condições de cultivo, como o tempo de fermentação, umidade e temperatura, além de outros fatores. No presente trabalho foram avaliadas a capacidade da produção das enzimas celulolíticas (celulase total, endoglucanase e xilanase) pelos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* a partir da fermentação em estado sólido da casca de arroz e casca de amendoim e investigar a influência dos parâmetros tempo de incubação, temperatura e pH sobre a atividade residual das enzimas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. A triagem inicial foi desenvolvida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando como variáveis, a temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade. Utilizando o Delineamento Box Behnken foi otimizada a produção das enzimas pelo fungo *A. oryzae*. Com a casca de arroz foram encontradas as seguintes condições: atividade enzimática da endoglucanase de 1,72 U/mL em 141,5 horas de fermentação, 33°C de temperatura e teor de umidade de 58,5% e a atividade enzimática da xilanase de 9,03 U/mL em 137 horas de fermentação, 30°C de temperatura com 60% de umidade. Com a casca de amendoim foram observadas as seguintes condições: atividade enzimática da endoglucanase de 4,29 U/mL em 192 horas de fermentação, 36°C de temperatura e teor de umidade de 50 %. A xilanase obteve uma atividade enzimática de 9,54 U/mL em 151 horas de fermentação, 36°C de temperatura com 50% de umidade, e a atividade enzimática da celulase total foi 0,400 U/mL em 133 horas de fermentação, 34°C de temperatura e 50% de umidade. As condições de reação das enzimas otimizadas (endoglucanase e xilanase) foi realizada utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 , ambas as enzimas produzidas a partir da casca de arroz e casca de amendoim demonstraram grande tolerância à temperatura de 50°C por cerca de 150 minutos. Com relação ao pH tanto a endoglucanase como a xilanase obtidas do processo fermentativo da casca de amendoim apresentaram melhor atividade residual a pH 7 a 9 e a endoglucanase obtida da casca de arroz se manteve uma maior atividade residual numa faixa de pH 3 a 5. A análise da atividade residual enzimática pode ser utilizada como direcionamento nos processos industriais, como exemplo, nas etapas de liquefação e digestão de polpas para a clarificação de sucos são empregadas celulasas com pH entre 2,0 e 4,0 e temperatura na faixa de 45 a 55°C por até 1 hora.

Palavras-Chave: Bioconversão fúngica; fungos filamentosos; estabilidade enzimática.

BRITO, A. R. OPTIMIZATION OF ENZYMES CELLULOLYTIC PRODUCTION BY FERMENTATION IN SOLID ON RICE HULL AND THE PEANUT SHELL. Itapetinga-BA: UESB, 2015. 97 p. (Dissertação: Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos – Área de Concentração em Ciência dos Alimentos).

ABSTRACT

The production of enzymes by solid state fermentation (SSF) is influenced by several factors such as type of microorganism, residual biomass and also by growing conditions, as fermentation time, humidity and temperature, and other factors. In this study were evaluated the ability of the production of cellulolytic enzymes (total cellulase, endoglucanase and xylanase) by microorganisms *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* from the solid state fermentation of rice husks and peanut shells and investigate the influence of the parameters incubation time, temperature and pH on the residual enzyme activity. The experiments were conducted in the Agribusiness Microbiology Laboratory at the State University of Santa Cruz - UESC. The initial screening was conducted with the full 2³ factorial design using as variables, temperature, fermentation time and moisture content. Using the Design Box Behnken was optimized the production of enzymes by *A. oryzae* fungus. With the rice husk the following conditions are found: enzymatic activity of endoglucanase 1,72 U/mL in 141,5 hours of fermentation, temperature 33°C and 58,5% moisture content and the enzymatic activity of xylanase 9,03 U ml in 137 hours of fermentation, temperature 30°C with 60% humidity. With peanut hulls of the following conditions are met: the endoglucanase enzyme activity of 4.29 U/mL at 192 hours of fermentation, temperature 36°C and 50% moisture content. The xylanase activity of the enzyme obtained 9,54 U/mL in 151 hours of fermentation, temperature 36°C with 50% humidity, and the enzymatic activity of whole cellulase was 0.400 U/ml at 133 hours of fermentation, 34°C temperature and 50% humidity. The reaction conditions for optimized enzymes (endoglucanase and xylanase) was performed using the full 2³ factorial design, both enzymes produced from rice hulls and peanut hulls showed high tolerance to 50°C temperature for about 150 minutes. With respect to the pH both endoglucanase and xylanase obtained from the fermentation of peanut hulls had better residual activity at pH 7 to 9 and endoglucanase obtained from rice husks remained greater residual activity in the pH range 3 to 5. The analysis of the residual enzymatic activity can be used as guidance in industrial processes, for example, the steps of liquefaction and pulp digestion for the clarification of juices are used cellulases with a pH between 2.0 and 4.0 and temperatures between 45 and 55 ° C for up to 1 hour.

Keywords: Fungal bioconversion; filamentous fungi; enzymatic stability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.1** - Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular dos vegetais.....18
- Figura 1.2** – (a) Estrutura de um filamento de celulose; (b) Esquema mostrando a organização das fibras da celulose.....19
- Figura 1.3** - Representação da xilana com a cadeia principal formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil com ramificações de ácido glucurônico, L-arabinofuranose e grupo acetil.....20
- Figura 1.4** - Estrutura do grão de arroz.....22
- Figura 1.5** - Amendoim em casca e casca de amendoim.....23
- Figura 1.6** - Fermentação em estado sólido.....24
- Figura 1.7** - Representação do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos.....26
- Figura 1.8** - Micro e macromorfologia do *Aspergillus niger*.....27
- Figura 1.9** - Micro e macromorfologia do *Aspergillus oryzae*.....28
- Figura 1.10** - Modelo sinérgico da ação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase.....30
- Figura 1.11** - Modelo sinérgico da ação das enzimas endoxilanases, exoxilanase, β -xilosidase.....31

CAPÍTULO II

- Figura 2.1** - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus niger*.....49

Figura 2.2 - Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Celulase total (FPASE) produzida por *A. niger* na casca de arroz; b) Xilanase produzida por *A. niger* na casca de arroz.....50

Figura 2.3 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da celulase total (FPASE), endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.....53

Figura 2.4 - Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Endoglucanase (CMCASE) produzida por *A. oryzae* na casca de arroz b) Xilanase produzida por *A. oryzae* na casca de arroz.....54

Figura 2.5 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.....57

Figura 2.6 - Superfície de resposta dos modelos ajustados: coluna (A) endoglucanase (CMCASE); coluna (B) Xilanase.....59

Figura 2.7 - Gráfico de Pareto da caracterização enzimática: a) endoglucanase; b) xilanase.....62

Figura 2.8 - Estabilidade enzimática ao pH, temperatura e tempo de incubação: a, b, c) endoglucanase – CMCase; d, e, f) xilanase produzidas por *A. oryzae*.....63

CAPÍTULO III

Figura 3.1 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCase), celulase total (FPASE) e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus niger*.....82

Figura 3.2 - Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Celulase total (FPASE) produzida por *A. niger* na casca de amendoim b) Xilanase produzida por *A. niger* na casca de amendoim.....83

Figura 3.3 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da celulase total (FPASE), endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por <i>Aspergillus oryzae</i>	86
Figura 3.4 - Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Endoglucanase (CMCASE) produzida por <i>A. oryzae</i> na casca de amendoim b) Xilanase produzida por <i>A. oryzae</i> na casca de amendoim.....	87
Figura 3.5 - Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por <i>Aspergillus oryzae</i>	91
Figura 3.6 - Superfície de resposta dos modelos ajustados: coluna (A) endoglucanase (CMCASE); coluna (B) Xilanase.....	92
Figura 3.7 - Gráfico de Pareto da caracterização enzimática: a) endoglucanase; b) xilanase.....	96
Figura 3.8 - Estabilidade enzimática ao pH, temperatura e tempo de incubação: a, b, c) endoglucanase – CMCase; d, e, f) xilanase produzidas por <i>A. oryzae</i>	97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1 - Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos.....	21
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 2.1 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada na triagem para produção enzimática.....	45
Tabela 2.2 - Variáveis codificadas e não codificadas do delineamento Box Behken para a otimização das enzimas.....	45
Tabela 2.3 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada nas condições de reação enzimática.....	46
Tabela 2.4 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo <i>A. niger</i>	47
Tabela 2.5 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por <i>A. niger</i>	47
Tabela 2.6 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo <i>A. oryzae</i>	51
Tabela 2.7 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por <i>A. oryzae</i>	52
Tabela 2.8 - Matriz do DBB (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.....	55
Tabela 2.9 - ANOVA para as atividades enzimáticas da endoglucanase e xilanase do DBB produzidas por <i>A. oryzae</i>	56
Tabela 2.10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas % da atividade enzimática residual da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.....	60
Tabela 2.11 - ANOVA para a atividade enzimática residual da endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial completo 2^3	61

CAPÍTULO III

Tabela 3.1 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada na triagem para produção enzimática.....	77
Tabela 3.2 - Variáveis codificadas e não codificadas do delineamento Box Benhken para a otimização das enzimas.....	78
Tabela 3.3 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada nas condições de reação enzimática.....	79
Tabela 3.4 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo <i>A. niger</i>	80
Tabela 3.5 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por <i>A. niger</i>	80
Tabela 3.6 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo <i>A. oryzae</i>	84
Tabela 3.7 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por <i>A. oryzae</i>	85
Tabela 3.8 - Matriz do DBB (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.....	88
Tabela 3.9 - ANOVA para as atividades enzimáticas da endoglucanase e xilanase do DBB produzidas por <i>A. oryzae</i>	89
Tabela 3.10 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas % da atividade enzimática residual da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.....	95
Tabela 3.11 - ANOVA para a atividade residual enzimática da endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial completo 2^3	95

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1.1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 – Objetivo Geral.....	17
1.2.2 – Objetivos Específicos.....	17
1.3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
1.3.1 – Resíduos Lignocelulósicos.....	18
1.3.1.1 – Casca de Arroz.....	21
1.3.1.2 – Casca de Amendoim.....	22
1.3.2 – Fermentação em estado sólido (FES).....	23
1.3.2.1 – Micro-organismos empregados na FES.....	25
1.3.3 – Enzimas.....	28
1.3.3.1 Celulases.....	29
1.3.3.2 Xilanase.....	30
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO II	39
Triagem, otimização da produção e caracterização de celulases e xilanase a partir da bioconversão da casca de arroz por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	39
CAPÍTULO III	72
Triagem, otimização da produção e caracterização de celulases e xilanase a partir da bioconversão da casca de amendoim por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	72

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos são fonte de matéria-prima renovável, e dependendo da tecnologia podem ser utilizadas para o funcionamento das indústrias. Os setores agrícolas e agroindustriais produzem uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos os quais são em sua maior parte eliminadas por incineração. Esse processo representa a perda de biomassa, além dos nutrientes que o compõe. Nesse sentido, a reutilização da biomassa lignocelulósica ganhou destaque em diversas pesquisas com o intuito de serem convertidas em diferentes produtos de alto valor agregado como os biocombustíveis, produtos químicos, unidades construtoras, produção de enzimas, entre outros (ANWAR et al., 2014; WANG et al., 2012).

A biomassa vegetal é uma rede complexa e resistente de moléculas, destacando os polímeros, celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por meio de ligações covalentes (SANCHEZ et al., 2009). Dentre as diferentes biomassas lignocelulósicas a casca de arroz e casca de amendoim representa aproximadamente 20% e 30% do peso total do grão, respectivamente (CONAB, 2014). Além de abundantes, esses resíduos vêm despertando interesse como matérias-primas para processos fermentativos e obtenção de produtos microbiológicos.

Dentre os processos fermentativos a fermentação em estado sólido pode utilizar esses resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes para o crescimento de micro-organismos (LOPEZ et al., 2013). Esse processo fermentativo se caracteriza pelo crescimento de micro-organismo, comumente os fungos filamentosos, em substratos sólidos com baixo teor de água livre. (THOMAS et al., 2013; SINGHANIA et al., 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são economicamente importantes, devido à produção de diversos produtos de interesse para o setor industrial, tais como os ácidos orgânicos, biossurfactantes, e na produção de diversas enzimas, sendo este fungo capaz de produzir mais de 19 tipos diferentes de enzimas como, amilases, pectinases, celulases, xilanase, proteases, lactases, peroxidases, entre outros (SANTOS et al., 2011; PANDEY et al., 1999).

O mercado industrial de enzimas cresce continuamente devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos

convencionais (REINEHR, et al., 2014; ORLANDELLI, et al., 2012). O mercado mundial de enzimas deve chegar a 7,652 bilhões de dólares em 2020, de acordo com um novo estudo da Grand View Research, Inc. O aumento da demanda para aplicações no ramo de alimentos e bebidas, detergentes e ração animal impulsiona esse mercado. A aplicação de enzimas no setor alimentício foi o maior segmento do mercado, respondendo por 37,5% da receita global em 2013. O aumento da demanda por alimentos processados juntamente com a melhoria da qualidade desses alimentos é fundamental para desempenhar um papel importante no desenvolvimento enzimático. A indústria de detergentes foi o segundo maior segmento de aplicação, com uma receita superior a US\$ 900 milhões em 2013 (PRWEB, 2014). Dentre as enzimas de interesse comercial encontram-se as celulases e hemicelulases devido as suas diversas aplicações em vários segmentos industriais.

O maior obstáculo para a aplicação de enzimas em grande volume nos processos industriais é o alto custo da sua produção. Nesse sentido, investimento em pesquisas tem sido realizado avaliando a biomassa lignocelulósica, a cepa microbiana utilizada, as condições de cultivo para a bioprospecção de enzimas, como uma estratégia viável para a obtenção de produtos de alto valor agregado a um baixo custo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção da celulase total, endoglucanase e xilanase por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, utilizando a casca de arroz e casca de amendoim como fonte de nutrientes durante a fermentação em estado sólido, bem como estudar simultaneamente o efeito do pH, tempo e temperatura sobre as condições de reação enzimática.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção da celulase total, endoglucanase e xilanase por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, utilizando a casca de arroz e casca de amendoim como fonte de nutrientes durante a fermentação em estado sólido, bem como estudar simultaneamente o efeito do pH, tempo e temperatura sobre as condições de reação enzimática.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial da casca de arroz e casca de amendoim como substratos na produção de enzimas celulolíticas no processo de fermentação em estado sólido;
- Avaliar o potencial do *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* como produtor das enzimas celulolíticas;
- Estudar os parâmetros temperatura, teor de umidade e tempo de fermentação na produção das enzimas;
- Determinar as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase no extrato obtido;
- Estudar o efeito simultâneo do tempo, temperatura e pH sobre as condições de reação enzimática.

1.3 REFERENCIAL TEÓRICO

1.3.1 Resíduos Lignocelulósicos

Os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente difundidos em vários segmentos industriais e tem se mostrado promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais. Isto porque os resíduos agroindustriais devido ao baixo ou nenhum valor comercial é uma alternativa atrativa e promissora considerando o elevado teor de carboidratos dessa biomassa, atuando como fonte de nutrientes (CUNHA et al.,2005; MEINHARDT et al., 2005).

As biomassas residuais de composição lignocelulósicas são consideradas o recurso renovável mais abundante da terra, que consiste em cadeias de açúcares (polissacarídeos) fortemente associadas e ligadas covalentemente. Os componentes principais dos materiais lignocelulolíticos consistem de três grandes polímeros tais como celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1.1), no qual as microfibrilas de celulose encontram-se incorporados dentro de uma matriz composta por hemicelulose e lignina, conferindo maior estabilidade e proteção à parede celular aos ataques microbianos e enzimáticos (LYND et al 2008; PETERS, 2014).

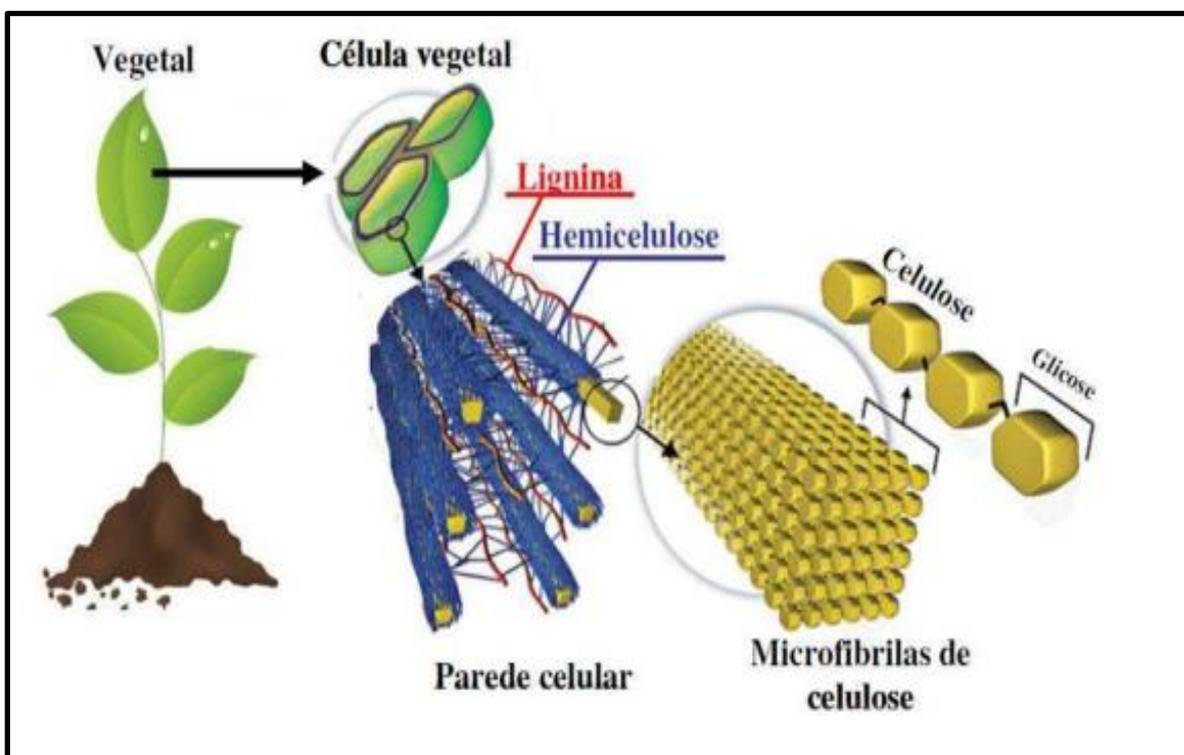


Figura 1.1 – Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular dos vegetais (RITTER, 2008).

A celulose é o componente principal da parede celular dos materiais lignocelulósicos. É um polímero constituído da união de duas moléculas de glicose através de ligações β -1,4-glicosídica, formando a celobiose. Estes formam longas cadeias ligadas entre si por pontes de hidrogênio e força de Van Der Waals, resultando em microfibrilas de alta resistência e insolúvel. Estas microfibrilas possuem orientações distintas em toda a estrutura, apresentando diferentes níveis de cristalinidade, dessa forma, a celulose consiste de duas regiões: cristalina (alto grau de cristalinidade) com estrutura arranjada de forma ordenada e amorfa (baixo grau de cristalinidade) com cadeias interligadas de forma aleatória. Quanto maior o índice de cristalinidade mais difícil à biodegradação da celulose (ZHENG, et al., 2014; SÁNCHEZ, 2008). A Figura 1.2 apresenta a estrutura e esquema das fibras da celulose.

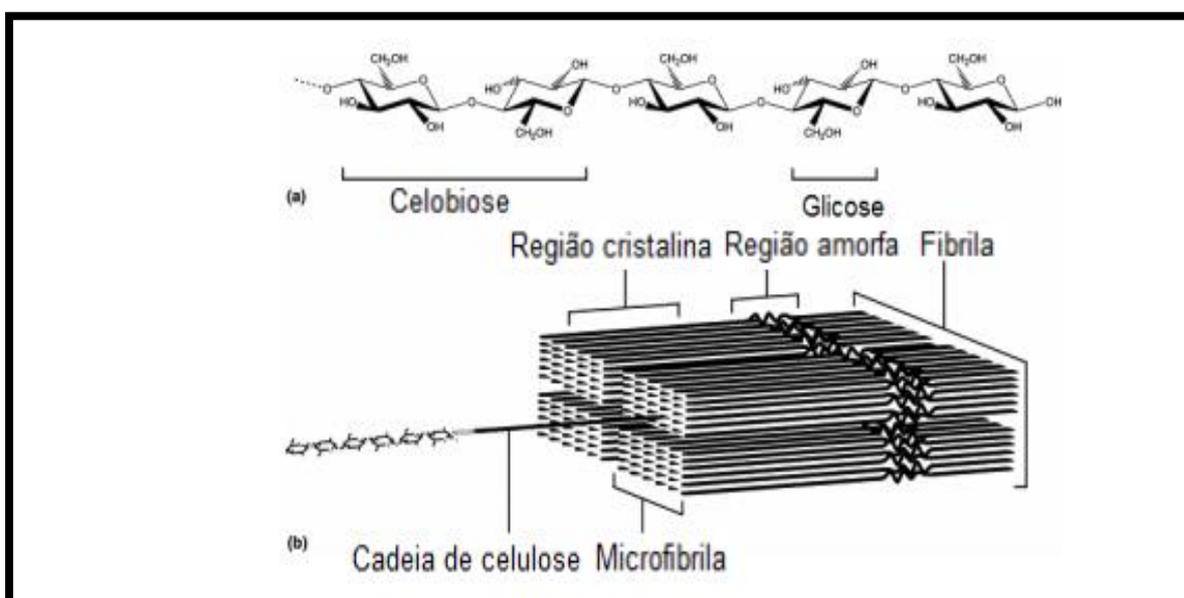


Figura 1.2 – (a) Estrutura de um filamento de celulose; (b) Esquema mostrando a organização das fibras da celulose. Adaptado de DESVAUX, 2005.

Depois da celulose, a lignina é o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, é um heteropolímero amorfo e aromático, não solúvel em água e é formada por unidades de fenilproprano unidas entre si por ligações não hidrolizáveis, tais como: álcool coniferil, sinapil e cumaril. A lignina é ligada a celulose e hemicelulose, formando uma estrutura tridimensional, rígida e impenetrável, o que dificulta a degradação (ZHENG, et al., 2014; SÁNCHEZ, 2008).

A hemicelulose é mais variada em estrutura e composição do que a celulose. São heteropolissacarídeos contendo diversos açúcares como pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, galactose, manose, ramanose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-

glicurônico e ácido galacturônico) que consistem de cadeias poliméricas ramificadas com grau de polimerização de 100 a 200 unidades de açúcares, unidos na maioria por ligações β -1,4-glicosídicas, além de serem amorfos e possuírem massa molecular baixa (DYK e PLETSCHE, 2012; ZHENG, et al., 2014; LIMA & RODRIGUES, 2007). São classificadas de acordo com a composição dos principais açúcares presentes, como, xilanas, arabinoxilanos, galactomananos, glucomananos e xiloglucananos que são as classes mais frequentes (CASTRO, 2005). Dentre esses, a xilana constitui o principal componente da hemicelulose, sua cadeia principal é formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus por 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose, grupos acetil, ácido ferúlico e *p*-cumárico (Figura 1.3). A xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose, sendo importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (COLLARD e BLIN, 2014; COLLINS et al., 2005).

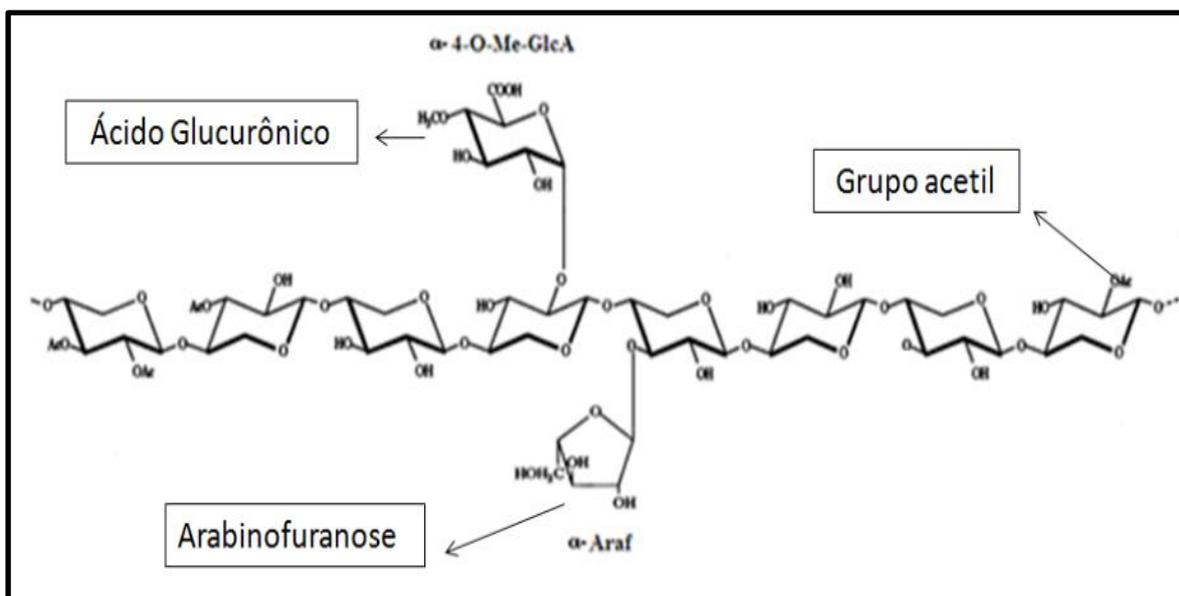


Figura 1.3 - Representação da xilana com a cadeia principal formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil com ramificações de ácido glucurônico, L-arabinofuranose e grupo acetil. Adaptado COLLINS et al., 2005.

Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como fonte de composto lignocelulolíticos, como o farelo de cevada, palha de milho, bagaço de cana, casca de arroz, palha de trigo, casca de aveia, palha de sorgo, casca de amendoim, etc. A biomassa é composta aproximadamente de 30 a 40% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose, 5 a 20% de lignina (Tabela 1.1), além de pequenas quantidades de outros componentes em sua

composição: cinzas, proteínas, pectinas, minerais, amido, dentre outros (BARR et al., 2012; SARKAR et al., 2012; BRAGATTO, 2010).

Tabela 1.1 Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	celulose (%)	hemicelulose (%)	lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Palha de milho	42,6	21,6	8,2
Bagaço de cana	32 - 36	28 - 30	18,4
Palha de arroz	32-47	19 -27	5 - 24
Palha de trigo	35 - 47	20 - 30	8 - 15
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1

Fonte: Adaptado SARKAR et al., 2012.

O Brasil apresenta vantagens para o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias-primas renováveis devido à vasta biodiversidade existente em seu território, cultivos agrícolas em grande extensão, diversidade de clima, cujo bioprocessamento desperta grande interesse econômico e social (COUTINHO, BONTEMPO, 2010).

1.3.1.1 Casca de Arroz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma cultura de grande importância socioeconômica para muitos países em desenvolvimento como o Brasil, pois está entre os cereais mais consumidos do mundo (WALTER, 2008). A produção mundial de arroz em casca na safra de 2013/14 atingiu 470,6 milhões de toneladas e o Brasil atingiu 12,22 milhões de toneladas com um aumento de 4% da safra anterior, ocupando o nono lugar no ranking mundial (CONAB, USDA 2013). Dentre os estados do Brasil, o Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, respondendo por cerca de 68,1% do total produzido (IBGE, 2014).

A produção e beneficiamento do arroz é uma das atividades mais tecnológicas do setor agrícola brasileiro, um grão de arroz pode ser dividido em três partes principais: casca, farelo e grão (Figura 1.4). Dentre os subprodutos gerados, a casca de arroz consiste no principal resíduo da indústria arroseira, correspondendo com aproximadamente 20% do peso total do grão, com geração anual em torno de 120 milhões de toneladas, sendo considerado, um resíduo muito abundante, de difícil digestibilidade por animal devido a grande quantidade de cinza / sílica e características abrasivas, tornando esse produto de baixo valor comercial (SAHA e COTA, 2008).

A casca de arroz contém em torno de 28,6% de celulose, 24,4% de lignina, 28,6% de hemicelulose e 18,4 % de matéria inorgânica, que é composta de sílica, óxido de potássio, sódio, magnésio, cálcio e traços de outros elementos (WORASUWANNARAK et al., 2007) . Com a intenção de melhorar o aproveitamento da casca de arroz, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de investigar suas propriedades como isolante, adsorvente, absorvente e filtrante. DEBIAGE, et al (2012) e PINTO et al (2013) relatam que estudos mais recentes utilizam a casca de arroz na obtenção de combustível gasoso e álcool, na hidrólise enzimática, na utilização das cinzas como adsorventes de óleos, aditivo em concretos e materiais poliméricos.

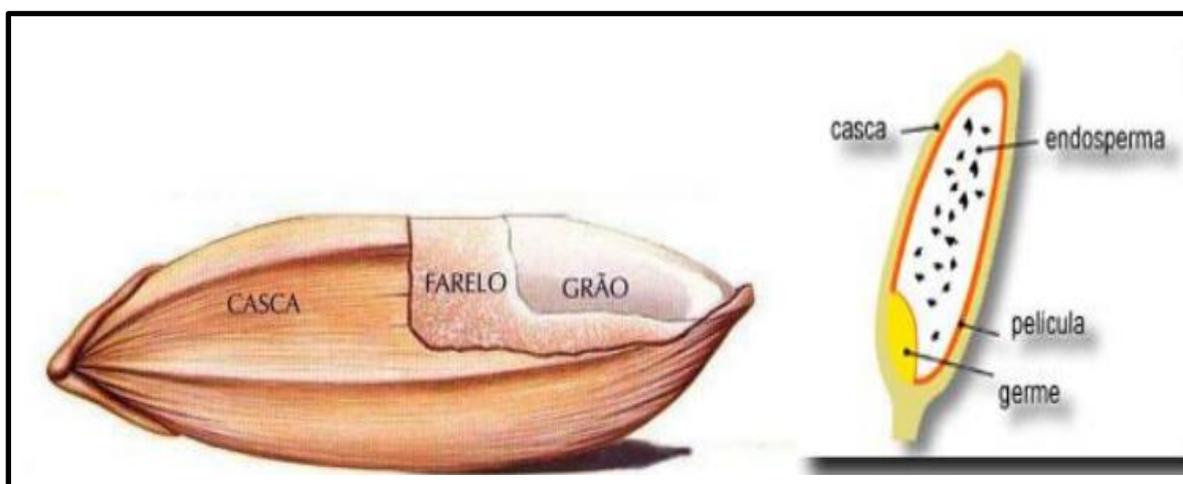


Figura 1.4 – Estrutura do grão de arroz (JOSAPAR, 2008).

1.3.1.2 Casca de Amendoim

A planta do amendoim (*Arachis hypogaea*) é originária da América do Sul, e hoje é cultivada em todas as regiões tropicais e temperada do mundo, sendo considerada uma das principais culturas de oleaginosas ocupando o quarto lugar no ranking mundial, possui alto valor social e econômico, pois tem se destacado como alimento saudável e de grande importância para muitos países, visto que possui elevado teor de proteínas e óleo insaturado (USDA, 2013; EMBRAPA, 2013).

A produção mundial de amendoim é de aproximadamente 39,9 milhões de toneladas por ano, sendo a China o principal produtor mundial, seguido pela Índia e Estados Unidos (USDA, 2013). O Brasil ocupa o vigésimo lugar com uma produção na safra de 2013/2014 de 289,4 mil toneladas, com destaque para o Estado de São Paulo representando 89% da produção nacional (CONAB, 2014).

Os produtos destinados ao mercado interno e externo derivados do beneficiamento agroindustrial do amendoim são: amendoim em casca e descascado, óleo bruto e refinado,

torta ou farelo e sementes para cultivo. A casca do amendoim (Figura 1.5) é um subproduto do beneficiamento, abundante e de baixo valor comercial, no qual a sua exploração e utilização deve trazer benefícios econômicos, visto que esse resíduo é formado por compostos lignocelulósicos que apresentam potencialidades de aproveitamento para desenvolvimentos de novos produtos e materiais (BARBOSA et al., 2014; ZHAO et al., 2014; CARASCHI, et al., 2009).



Figura 1.5 – Amendoim em casca e casca de amendoim: Fonte: Google imagens.

1.3.2 - Fermentação em Estado Sólido

Com o avanço da biotecnologia, a fermentação em estado sólido vem ganhando renovado interesse devido a suas potenciais aplicações como na produção de enzimas e demais compostos bioativos. A partir de técnicas de conversão biológica é possível utilizar os resíduos agroindustriais como substrato, dessa forma, a sua aplicabilidade se torna promissora por utilizar matéria-prima de baixo valor comercial, contribuindo para a redução do custo operacional da produção enzimática (THOMAS, et al., 2013; SANTOS et al, 2013).

A fermentação em estado sólido (Figura 1.6) é definida como um processo de fermentação no qual o crescimento microbiano se desenvolve na superfície ou no interior de uma matriz sólida com baixo teor de água livre, no entanto, o substrato deve possuir a umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do micro-organismo. A matriz sólida pode ser qualquer fonte de macro e micronutrientes ou pode ser um suporte inerte impregnado com os nutrientes adequados que permitam o desenvolvimento dos micro-organismos (THOMAS, et al., 2013; ZHU et al., 2012).



Figura 1.6 – Fermentação em estado sólido. Fonte: A autora.

Dentre as vantagens relatadas em diversos estudos e pesquisas para a fermentação em estado sólido quando comparada a outros processos fermentativos se deve a simplicidade de operação, menor requerimento de espaço e energia, alta concentração dos produtos e principalmente tanto na produção de enzimas quanto na obtenção de substâncias de interesse na indústria alimentícia, pois tem mostrado que pode ofertar maior produtividade ou produtos com melhores características. (ZHU et al., 2012; COUTO e SANROMAN, 2006).

Segundo Santos et al., (2005) e Pinto et al., (2006), nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento microbiano favorece a formação de enzimas, dessa forma, se faz necessário a realização de análises que devem estar relacionadas com as variáveis que irá afetar o bioprocessamento em questão. Portanto, na fermentação em estado sólido, vários fatores são decisivos para produção do bioproduto desejado, tais como: umidade, temperatura de incubação, pH, o período de fermentação, substratos, aeração, agitação e nutrientes adicionais que afetam significativamente o crescimento celular e a formação de produtos (SANTOS, 2007).

Dentre os fatores mencionados que obtêm influencia na otimização dos cultivos em estado sólido, temos, o teor de umidade, que deve ser adequada para o substrato permitindo a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Quando o teor de umidade é inferior ao mínimo exigido, a solubilidade dos nutrientes é limitada impedindo a absorção eficaz dos nutrientes pelos

micro-organismos, retardando o crescimento microbiano e conseqüentemente, obtendo uma menor produção do produto desejado. Quando o teor de umidade é muito elevado, as partículas do substrato ficam rodeadas por uma camada espessa de água, tendendo a ficar coesas, e, por conseguinte, resulta em diminuição da porosidade do substrato, baixa difusão de oxigênio no interior do meio, aumentando o risco de contaminação e redução de troca gasosa, criando uma condição desfavorável ao crescimento micro-organismos aeróbio (YOON et al 2014; PINTO et.al, 2006).

Outro importante fator é a temperatura, grandes quantidades de calor são liberadas, sendo diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo, afetando diretamente a germinação de esporos, o crescimento e a formação do produto desejado, devido ao acúmulo de calor metabólico gerado, pois a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica (PINTO et al., 2006). A temperatura ótima para crescimento da maioria dos fungos compreende a faixa de 25 a 35°C, a aplicação de altas temperaturas impõe um efeito adverso na produção das enzimas, visto que as mesmas podem ser desnaturadas, logo, é desejável que a temperatura da fermentação esteja na mesma faixa ótima tanto para o crescimento do fungo como para a produção enzimática (YOON et al., 2014).

O tempo de fermentação está relacionado com a presença de nutrientes dispersos ao longo da fermentação contribuindo para o crescimento do micro-organismo. À medida que os micro-organismos vão consumindo os nutrientes e ocorrendo o esgotamento destes, há conseqüentemente a diminuição da produção microbiana e por fim o declínio da produção de metabólitos (SANTOS et al., 2013). Portanto, o controle das variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características uniformes e constantes (DEL BIANCHI et al., 2001; PANDEY et al., 2002).

1.3.2.1 Micro-organismos empregados na FES

Os fungos filamentosos são os micro-organismos capazes de decompor a matéria orgânica lignocelulósica e utilizá-la como fonte de carbono e energia. Está entre os organismos mais empregados nos processos biotecnológicos, sendo os mais adaptáveis ao processo de fermentação em estado sólido, pois o ambiente que se assemelha ao seu habitat natural, ou seja, com baixa atividade de água, o que torna mais fácil de conservar e controlar o seu ciclo morfológico, facilitando o seu crescimento no substrato sólido e, portanto obtendo maior rendimento do produto desejado. (HOLKER e LENZ, 2005).

A forma de crescimento dos fungos filamentosos é uma vantagem sobre os microorganismos unicelulares (Figura 1.7). Após a esporulação, a hifa do fungo se desenvolve em um emaranhado micelial, este por sua vez, pode projetar-se formando hifas aéreas ou penetrar o substrato. A atividade metabólica ocorre principalmente próxima à superfície do substrato e entre os poros, contudo regiões expostas do micélio (hifas aéreas), também mostram metabolismo e servem como transportadoras de substâncias para as hifas penetrativas. De forma coordenada ao crescimento, os metabólitos excretados pelos microorganismos permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos produtos (HÖLKER e LENZ, 2005).

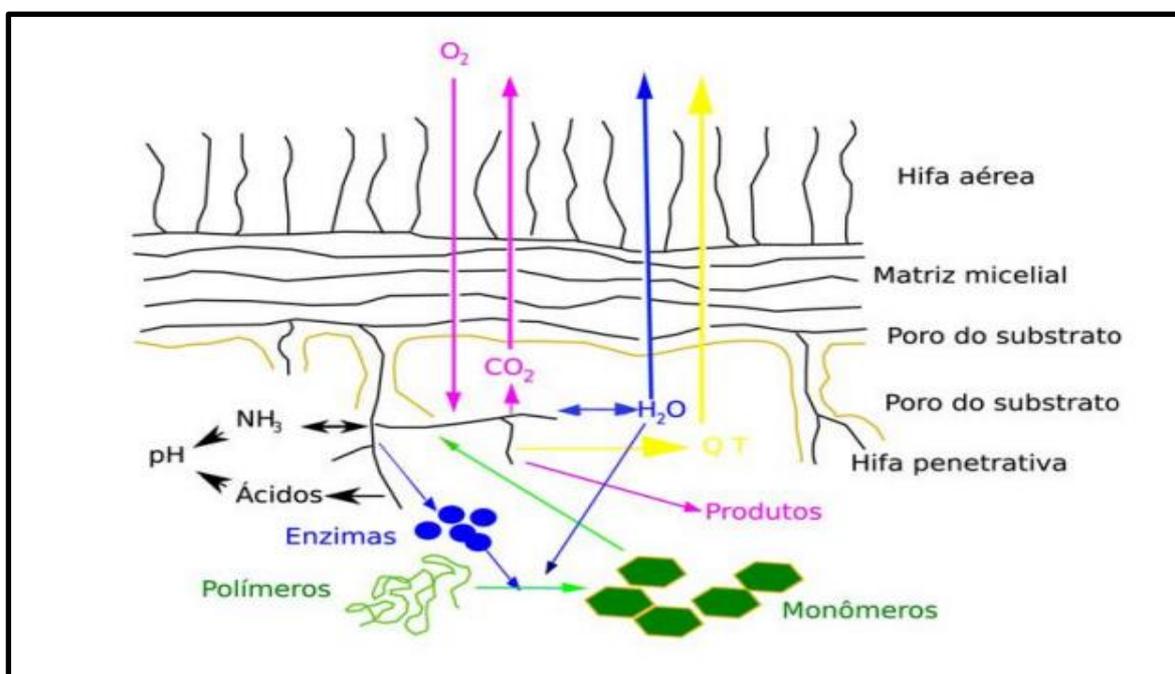


Figura 1.7 – Representação do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos (HOLKER; LENZ, 2005).

Os fungos filamentosos empregado na fermentação em estado sólido de importância industrial são amplamente disseminados na natureza e geralmente pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Dentre estes, o gênero *Aspergillus* são bastante utilizadas na produção de alimentos, enzimas, biossíntese química e transformação de compostos (PANDEY, 2003; AMORIM, 2011).

O gênero *Aspergillus* são os mais abundantes dentre os fungos filamentosos, apresentam colônias com coloração inicialmente branca, amarelo, passando para o marrom ou para o negro, geralmente tem crescimento rápido e exuberante. A taxonomia reconhece

150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e facilmente distinguíveis. São espécies consideradas interessantes, não só pela sua aplicação biotecnológica, mas também pela sua importância econômica devido às suas propriedades metabólicas. *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são uma das poucas espécies de fungos que receberam o status de GRAS (Generally Regarded As Safe), conferido pela Food and Drug Administration – FDA (AMORIM, 2011; FDA, 2014).

Aspergillus niger (Figura 1.8) obteve sua primeira importante função em 1919 na indústria de alimentos, pois apresentou uma alta produtividade na formação do ácido cítrico, e foi a partir de 1960 que sua utilização expandiu tornando grande produtor de enzimas (SCHUSTER et al., 2002). É apreciado no meio industrial por sua elevada capacidade de fermentação e elevados níveis de secreções de proteínas, além de serem reconhecidos como excelentes produtores de celulasas e xilanase a partir de resíduos lignocelulósicos (LIU et al., 2011, SANCHEZ, 2009).

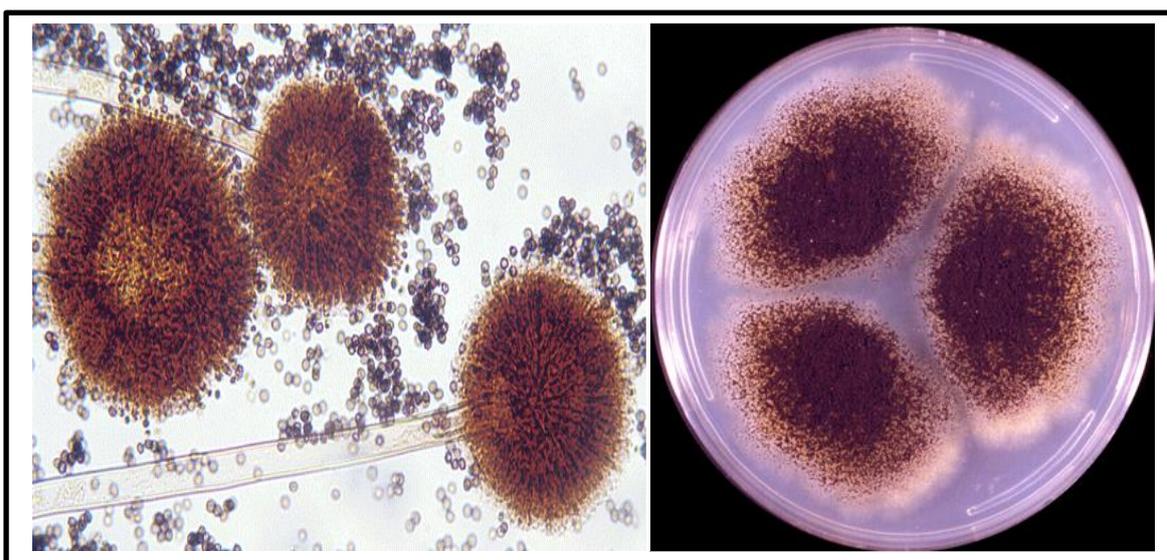


Figura 1.8 – Micro e macromorfologia do *Aspergillus niger*. Fonte: Mycology Online.

Aspergillus oryzae (Figura 1.9) é utilizada há um milênio na produção das tradicionais comidas fermentadas da culinária japonesa (MACHIDA et al., 2005) é um micro-organismo amplamente utilizado no setor industrial na fabricação de sake (destilado de arroz), miso (pasta de soja) e shoyu (molho de soja). As linhagens industriais de *A. oryzae* são conhecidas pelo seu potencial de produção de várias enzimas em diferentes formas de cultivo, tais como amilases, proteases, hidrolases, etc. (MURAKAMI et al., 1991).

A capacidade de secretar grandes quantidades de proteínas e o desenvolvimento de um sistema de transformação deve ter facilitado o uso de *A. oryzae* em processos de biotecnologia moderna. A constatação de uma maior expressão de genes envolvidos no metabolismo, particularmente aquelas para a síntese de metabólitos secundários, onde especifica os genes de secreção de enzimas hidrolíticas e metabolismo de aminoácidos confirmam que *A. oryzae* é um micro-organismo ideal para a fermentação (MACHIDA et al., 2008; MACHIDA et al., 2005).

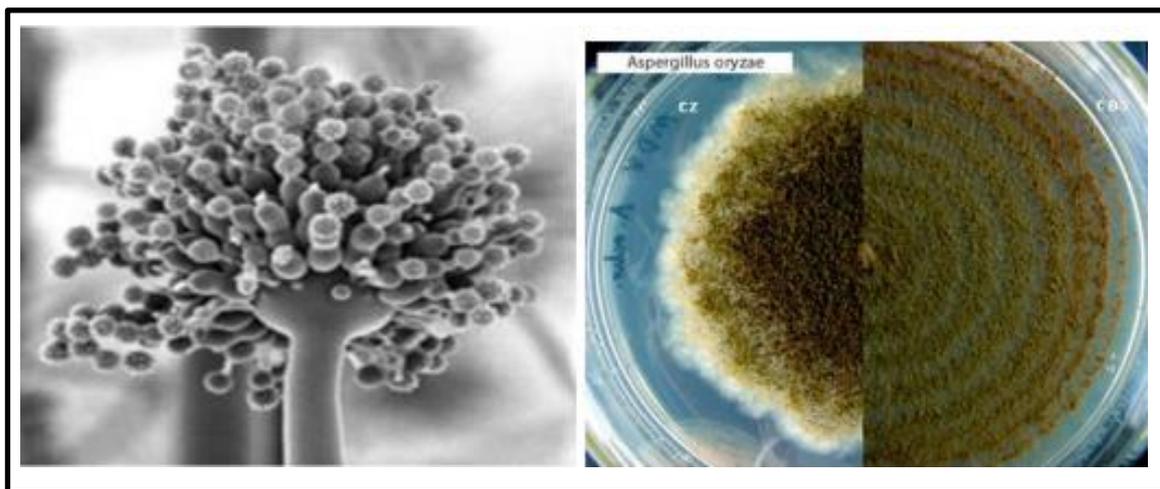


Figura 1.9 – Micro e macromorfologia do *Aspergillus oryzae*. Fonte: Mycology Online.

1.3.3. Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas, sua função é viabilizar o metabolismo celular (catabólico e anabólico), logo se trata de um composto de suma importância para o desenvolvimento microbiano (WANDERLEY et al., 2011). Apresentam elevada importância nos processos biotecnológicos e industrial, pois aceleram reações termodinamicamente favorecidas, são versáteis, estereoespecíficas, e tendem a melhorar a qualidade do produto final (COELHO et al., 2008).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam: oxidoreductase, transferases, hidrolases, liases, isomerases, e ligases (COELHO et al., 2008; FRANTZ et al., 2014). O uso de enzimas na tecnologia de alimentos é vantajoso porque, não apresentam toxicidade e não formam produtos indesejáveis (LEHNINGER, 2011).

As enzimas podem ser obtidas de animais (pancreatina, tripsina, quimotripsina, pepsina, renina e outras), vegetais (papaína, bromelina, ficina e outras) ou por micro-organismos. No entanto, as de origem microbiana tem sido alvo de muitos estudos, pois apresentam vantagens devido ao menor custo de produção, maior facilidade de produção

em larga escala, que além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (MUSSATO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; ALVES et al., 2002). Ainda são capazes de atuar em meio extracelular eficientemente, desde que o pH, a temperatura e o substrato estejam em condições adequadas para que ocorra a reação enzimática (COLEN, 2006).

O número de enzimas identificadas que constam na lista da Comissão Internacional de Enzimas (E.C.) é de cerca de 3000. Porém, somente cerca de 60 enzimas tem aplicação em diversos ramos industriais, e são utilizadas em quantidades significativas, sendo que 75% correspondem a hidrolases (celulases, pectinases, amilases, xilanase, peptidases, etc). O mercado está distribuído principalmente em enzimas utilizadas em detergentes (37%), têxteis (12%), amido (11%), panificação (8%) e ração animal (6%), (BON, 2008; COELHO, 2008; MITIDIARI et al.; 2002).

1.3.3.1 - Celulases

A celulase é a enzima que desempenha um papel fundamental na hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica da celulose, um componente dominante da parede celular das plantas. A produção de celulases é uma importante área de pesquisa. No mercado industrial, ocupa a terceira posição no ranking mundial, representando 20% do volume total de enzimas comercializadas. A forte demanda da celulase é atribuída as suas principais aplicações na indústria de papel e celulose, têxtil, alimentos e bebidas, indústria de detergentes e ração animal. Esta demanda tende a ser fortemente impulsionada caso o etanol obtido da biomassa lignocelulósica se torne o principal combustível utilizado (YOON et al., 2014; SINGHANIA et al., 2010).

Celulase é um complexo enzimático, formado por três componentes que atuam sinergicamente e são classificadas como indutoras, uma vez que sua produção é induzida pela presença de celulose no meio, como única fonte de carbono (OGEDA e PETRI, 2010; TRIVEDI et al., 2011). São compostos de endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases, que hidrolisam a matriz celulósica liberando principalmente glicose (MAEDA et al., 2012).

As endoglucanases ou endo- β -1,4-glucanase ou carboximetilcelulase (EC 3.2.1.4) são a enzima que dá início à hidrólise, clivam o polímero de celulose nas regiões internas da estrutura amorfa, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização,

criando novos terminais redutores e não redutores da cadeia. Os produtos incluem glicose, celobiose e dextrinas (CASTRO e PEREIRA, 2010; NARRA et al., 2014).

O segundo grupo são representadas por exoglucanases ou $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glicanase}$ ou avicelase que são compostas pela celobiohidrolase (CBH I e II) e glucano-hidrolase (GH). A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) libera glicose diretamente do polímero. A celobiohidrolase I e II atua sobre as extremidades redutoras e não redutoras, respectivamente, das partes cristalinas da celulose liberando glicose e principalmente celobiose como produtos principais (NARRA et al., 2014; KUMAR et al., 2012; CASTRO e PEREIRA, 2010). E o terceiro grupo é a $\beta\text{-glicosidase}$ (EC 3.2.1.21) que cliva a celobiose em duas moléculas de glicose (MAEDA et al, 2012). O esquema da Figura 1.10 apresenta como ação catalítica do complexo celulolítico (celulases) na hidrólise da matriz celulósica atuando sinergicamente.

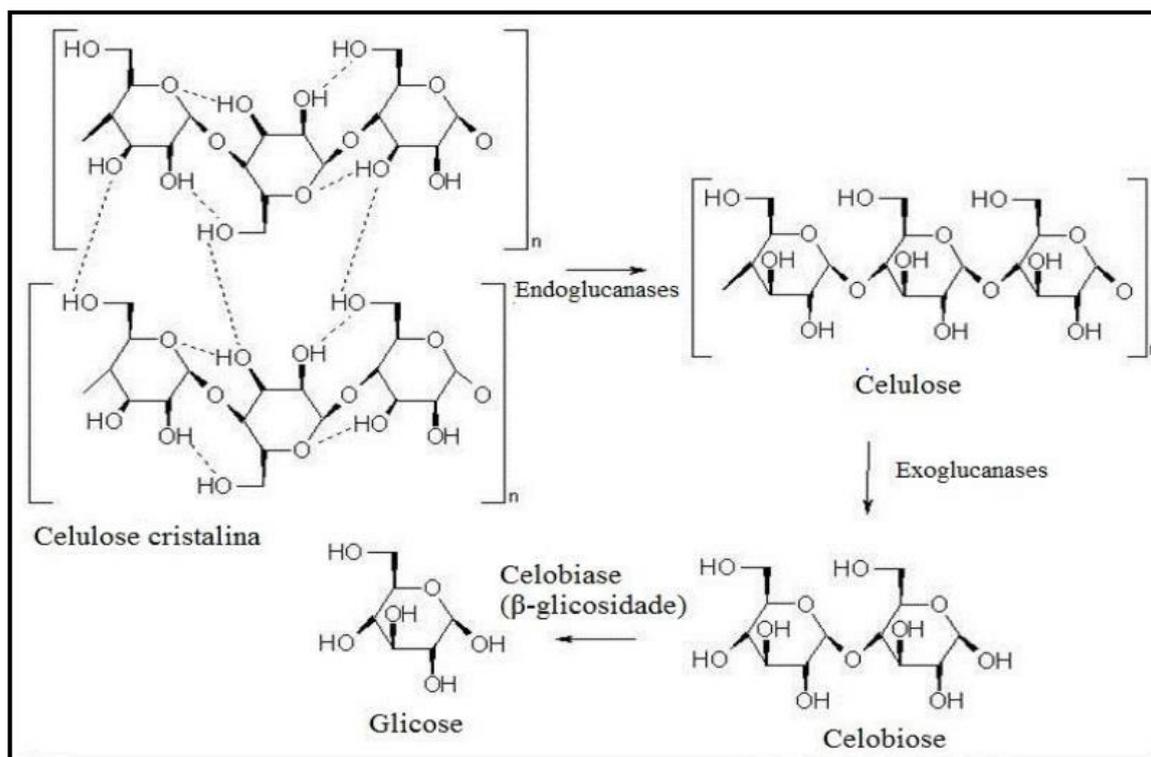


Figura 1.10 - Modelo sinérgico da ação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e $\beta\text{-glicosidase}$. Fonte: BORTOLAZZO (2011).

As enzimas do complexo celulolítico atuam de forma conjunta, apresentando um rendimento melhor do que o somatório das enzimas individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (CASTRO e PEREIRA, 2010).

1.3.3.2 – Xilanase

As xilanases são um grupo importante de enzimas industriais responsáveis pela hidrólise da xilana, o principal componente da hemicelulose presente nas paredes celulares das plantas. As principais enzimas envolvidas nesse processo são Endo-1,4- β -D-Xilanases (EC 3.2.1.8) que ataca a cadeia principal da xilana de forma aleatória produzindo principalmente xilo-oligossacarídeos e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) que hidrolisam os xilo-oligossacarídeos e xilobiose a partir da extremidade não redutora liberando xilose (IRFAN et al., 2014; GIRIO et al., 2010). A Figura 1.11 demonstra o modelo sinérgico das enzimas endoxilanases, exoxilanase e β -xilosidases.

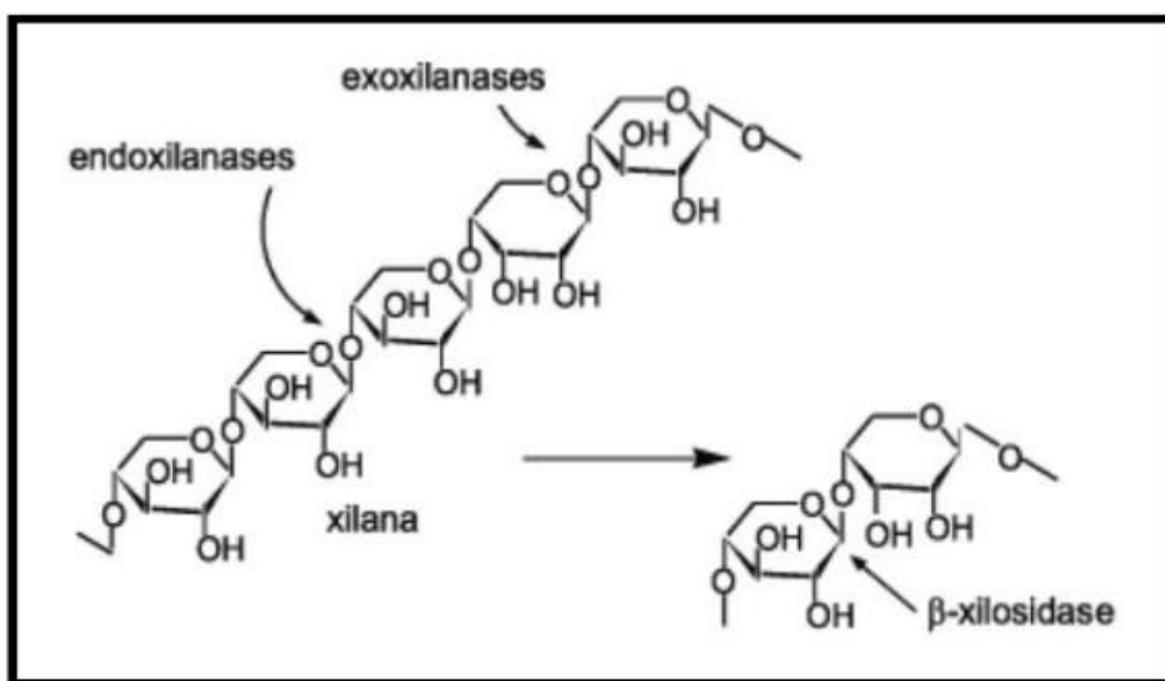


Figura 1.11 – Modelo sinérgico da ação das enzimas endoxilanases, exoxilanase, β -xilosidase. Fonte: GOMES et al., 2007.

A importância das xilanases de origem microbiana tem aumentado devido as suas aplicações biotecnológicas, tais como, o branqueamento de celulose, clarificação de suco de frutas e vinhos, produção de aditivos alimentares e ração animal processamento em padarias, na produção de etanol e xilitol. Os xilo-oligossacarídeos, produtos da hidrólise de xilana, exibem várias atividades biológicas incluindo atividades prebióticos, antioxidantes, antibacterianos, podendo também ser utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos (BISWAS et al., 2010; SAHA e GHOSH 2014; CHI et al., 2013).

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme foi observado pelo referencial teórico apresentado neste capítulo, vários trabalhos abordam o grande interesse na obtenção das enzimas celulasas e xilanase devido a sua ampla aplicação em processos biotecnológicos, abrangendo diversas áreas industriais, tais como, indústrias alimentícias, têxtil, ração animal, farmacêuticos, produtos químicos, produção de biocombustíveis, entre outros.

Os esforços pela redução de custos na produção de enzimas tem proporcionado o aumento das pesquisas pelas empresas envolvidas na sua fabricação em parceria com universidades e outros centros tecnológicos, através da utilização de cepas microbianas associadas às técnicas de fermentação. Atualmente a fermentação em estado sólido vem ganhando atenção pelos pesquisadores devido às vantagens econômicas que oferece como maquinários simples, fácil recuperação do produto, elevado rendimento e a utilização de substratos simples, como os resíduos agroindustriais de natureza lignocelulósica, abundante e de baixo valor comercial.

Portanto, o estudo da utilização da casca de arroz e casca de amendoim empregado na fermentação em estado sólido como substrato para a colonização do gênero *Aspergillus*, pode proporcionar produtos com alto valor agregado como as celulasas e xilanase de interesse industrial, além de ser uma alternativa viável socioeconômica para os resíduos agroindustriais.

Nos capítulos correntes, referente aos estudos com a casca de arroz e casca de amendoim, é apresentada a triagem da produção enzimática pelo planejamento fatorial completo, para explorar a tendência dos parâmetros empregados na produção das enzimas e determinar a maior capacidade de produção.

A otimização da produção enzimática é realizada pelo delineamento de Box Benhken e com o uso da metodologia de superfície de resposta, demonstra de forma simples as melhores condições de temperatura, tempo e teor de umidade empregado para obter os pontos ótimos na produção das enzimas estudadas.

É realizada a avaliação das condições de reação das enzimas empregando os três fatores temperatura, tempo e pH simultaneamente pelo planejamento experimental, possibilitando um maior conhecimento da ação sinérgica entre eles, e obtendo informações valiosas das enzimas para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. H. *et al.*; Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal Microbiology**, v.33, n.4, p. 225-230, 2002.

AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetinga, BA, 2011.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 7, p. 163-173, 2014.

BARBOSA, R. M.; HOMEM, B. F. M.; TARSITANO, M. A. A. Custo de produção e lucratividade da cultura do amendoim no município de Jaboticabal, São Paulo. **Rev. Ceres**, v. 6, n. 4, Viçosa July/Aug. 2014.

BARR, C. J.; MERTENS, J. A.; SCHALL, C. A.; Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource Technol.**, v.104, p. 480-485, 2012.

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

BON, E. P. S. Enzimas industriais: política e gestão. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002. Brasília. **Anais...**Brasília, DF, 2002.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* para a produção de bioetanol** Juliano Bragatto. 2010. 154 f. (Tese Doutorado) Fisiologia e Bioquímica de Plantas - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

CARASCHI, J. C.; LEAO, A. L.; CHAMMA, P. V. C. Avaliação de painéis produzidos a partir de resíduos sólidos para aplicação na arquitetura. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 47-53, 2009.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Jr. Produção, Propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, Vol. 33. No 1, 181-188, 2010.

CHI, W.-J.; LIM, J. H.; PARK, D. Y.; PARK, J. S.; HONG, S.-K. Production and characterization of a thermostable endo-type- β -xylanase produced by a new-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1736-1743, 2013.

COELHO, M.A.Z; SALGADO, A.M; RIBEIRO, B.D; **Tecnologia Enzimática**. FAPERJ, Editora EPUB, Rio de Janeiro, 2008.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. (TESE Doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da faculdade de Farmácia. Universidade Estadual de Minas Gerais, p. 206, 2006.

COLLARD, F.-X.; BLIN, J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 594–608, 2014.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (safra 2013/2014). Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em 30 de novembro de 2014.

COUTINHO, P. L. A.; BOMTEMPO, J. V. (2010) Uso de roadmaps tecnológicos para favorecer o ambiente de inovação: uma proposta em matérias primas renovável. **In: SIMPOI**, 2010.

CUNHA, M. A. A.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J. C. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n. 1, p. 61–70, 2005.

DEBIAGE, F.; IVANO, L. R. P. F. M.; NASCIMENTO, P. H. A.; MALI, S. Starch biodegradable packaging reinforced with lignocelulosic fibers from agroindustrial wastes. **Biochemistry And Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 57-67, 2012.

DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W. B.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. Ed. v. 2 São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. Cap 13. p. 247 – 270.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – O agronegócio do amendoim no Brasil. Brasília, 2013.

GIRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4775–4800, 2010.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.301–306, 2005.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IRO5 in solid state fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 7, p. 317-326, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 30 de novembro de 2014.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, B. E.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R. How biotech can transform biofuels. **Nat biotechnology**, v. 26, p. 169–172, 2008.

LOPEZ, J. A.; LAZARO, C. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering**, v. 77, p. 231-239, 2013.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERAJ, G., et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v.438, p. 1157 – 1161. 2005.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**. v.15, p. 173 – 183. 2008.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M .; PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p.38-44, 2013.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002. Brasília. **Resumos...**Brasília, DF, 2002.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production, purification, and Characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 88, p.150-161, 2014.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, V.33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. N. et al.; Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.853-860, 2006.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial; produção por fungos e aplicações. **Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.3636, p.14, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, n.2, p.81-84, 2003.

PETERS, N. K. Doe Bioenergy Reserarch Centers. **Bionergy Science Center**. DOESCO162, p.1-35, 2014.

PINTO, B.; CALLONI, G.; SILVA, S. A. Obtenção de acetato de celulose a partir da casca de arroz. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n.21, p.01–112, 2013.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, F. S. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v.74, p.17-20, 2006.

PRWEB (2014) – Disponível em: <http://www.prweb.com/pdfdownload/12061920.pdf>. Acesso em 13 dezembro de 2014.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipase de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através da

fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, v.37, n.3, p.454-460, 2014.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p.971-977, 2008.

SAHA, S. P.; GHOSH, P. Otimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. **Biocatal. Agric. Biotechnol.** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.03.003i>.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, n.21, 85-94, 2009.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, v. 35, p.1004-1010, 2012a.

SANTOS, S. F. M.; NOBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju visando sua utilização como substrato para fermentação semissólida. **Anais – XV Simpósio Brasileiro de Bioprocessos**. Recife. 2005.

SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by using residue *Aspergillus niger* of mango a substrate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.12, p.2210-2216, 2011.

SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, G. A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 65-71, 2013.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb.Tech.**, v. 46, p. 541–549, 2010.

SOCCOL C. R.; VANDERNBERGHE L. P. S.; MEDEIROS A. B. P.; KARP S. G.; BUCKERIDGE M.; RAMOS L. P et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n.10, p.4820-4825, 2010.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydr. Polym.**, v.83, p.891-897, 2011.

USDA - Foreign agricultural service: Table 13 peanut area, yield, and production. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx>>. Acesso em 01 de dezembro de 2014.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em 30 de novembro de 2014.

Worasuwannarak, N., Sonobe, T., Tanthapanichakoon, W. Pyrolysis behavior of rice straw, rice husk, and corncob by TG–MS technique. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**, v.78, p.265–271, 2007.

YOON, L. W.; ANG, T. C.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulose production. **Biomass and Energy**, v. 67, p.319-338, 2014.

ZHAO, B.; XIAO, W.; SHANG, Y.; ZHU, H.; HAN, R. Adsorption of light green anionic dye using cationic surfactant-modified peanut husk in batch mode. **Arabian Journal Chemistry**, 2014.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35-53, 2014.

ZHU, Z.; ZHANG, G.; LUO, Y.; RAN, W.; SHEN, Q. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. **Bioresource Technology**, v.112, p.254–260, 2012.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v.99, p.23-31, 2012.

CAPÍTULO II

Triagem, otimização da produção e caracterização de celulasas e xilanase a partir da bioconversão da casca de arroz por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

Resumo: O presente trabalho avaliou a influência do tempo, temperatura e teor de umidade sobre a produção das enzimas celulolíticas, endoglucanase e xilanase, durante a fermentação em estado sólido da casca de arroz, utilizando duas espécies fúngicas, o *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. A triagem inicial foi desenvolvida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando como variáveis, a temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade. Com o auxílio do Delineamento Box Behnken foi possível otimizar a produção das enzimas pelo fungo *A. oryzae*. Para a enzima endoglucanase foram encontrados os seguintes valores 141,5 horas de fermentação, 33°C de temperatura, teor de umidade de 58,5 % com a atividade enzimática de 1,72 U/mL. Para a xilanase a otimização esteve nos seguintes valores encontrados 137 horas de fermentação, 30°C de temperatura com 60% de umidade, obtendo uma atividade enzimática de 9,03 U/mL. Também foi realizada o estudo do efeito da temperatura, pH e tempo de incubação sobre a estabilidade enzimática utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 . As enzimas endoglucanase e xilanase demonstraram grande tolerância à temperatura de 50°C a cerca de 150 minutos. Com relação ao pH a endoglucanase se manteve mais estável numa faixa de 3 a 5 enquanto que a xilanase se mostrou mais estável a um pH 6 a 9. A casca de arroz pode ser utilizada na produção das enzimas e a estabilidade do extrato enzimático bruto demonstra grande potencial de aplicação nas indústrias de alimentos.

Palavras-Chave: fungos Filamentosos, fermentação em estado sólido, enzimas.

Screening, production of optimization and characterization of cellulase and xylanase from rice husk bioconversion by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.

Abstract: This study evaluated the influence of time, temperature and moisture content on the production of cellulolytic enzymes, endoglucanase and xylanase, during solid-state fermentation of rice husk, using two fungal species, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. The experiments were conducted in the Agribusiness Microbiology Laboratory at State University of Santa Cruz - UESC. The initial screening was conducted with the full factorial design 2^3 using as variables, temperature, fermentation time and moisture content. With the help of Delineation Box Behnken was possible to optimize the production of enzymes by the fungus *A. oryzae*. The endoglucanase enzyme found the following values 141.5 hours of fermentation temperature of 33°C, 58.5% moisture content with the enzymatic activity of 1.72 U/mL. For the optimization of xylanase was found in the following values 137 hours fermentation temperature of 30°C with 60% humidity,

obtaining an enzyme activity of 9.03 U/mL. The study of the effect of temperature, pH and incubation time on the enzyme stability was also performed using full factorial design 2³. The xylanase enzymes and endoglucanase showed high tolerance to temperature of 50°C to about 150 minutes. With respect to the endoglucanase pH remained stable in a range of 3 to 5 while xylanase was more stable at pH 6 to 9. The rice husk has the potential to produce enzymes and shows great stability in industrial applications premise and technological innovations.

Keywords: filamentous fungi, solid state fermentation, enzymes.

2.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação do ponto de vista ambiental, econômico e social na preservação dos recursos naturais e do meio ambiente com o concomitante desenvolvimento de tecnologias que minimizem os impactos ambientais causados pelos resíduos agroindustriais (ROSA, 2011; BAJAJ et al., 2012). A biomassa agroindustrial composta por resíduos lignocelulósicos é barata, renovável, abundante e fornece um recurso natural composto de nutrientes, que potencialmente podem ser convertidos em diferentes produtos de alto valor, dentre elas as enzimas (ANWAR et al., 2014)

Essa bioconversão pode ser realizada por fermentação em estado sólido, que se caracteriza pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos, com baixo teor de água livre, é, portanto um processo simples e econômico e que consiste em uma boa alternativa para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, necessitando na maioria dos casos apenas da adição de água para o desenvolvimento microbiano, geralmente os fungos filamentosos (ZEN et al., 2014; GUSMÃO et al., 2014).

Atualmente, o complexo de celulasas e xilanase contribuem para quase 20% do mercado de enzimas do mundo e sua utilização tem como entrave dentre outros fatores, o custo de produção (ANG et al., 2013). Portanto, uma das vantagens para minimizar os custos é o uso da biomassa lignocelulósica como matéria-prima empregada para bioprocessos, que pode viabilizar a produção enzimática (DHILLON et al., 2012). Visto que o Brasil é favorecido pela enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis, pode proporcionar um aumento na sua representatividade comercial e econômica da produção enzimática, no cenário nacional e internacional, trazendo benefícios sociais e ambientais (BON et al., 2008). Algumas dessas matérias-primas vêm

ganhando destaque, por conta do seu potencial aproveitamento para geração de renda, como a casca de arroz resultante das indústrias de beneficiamento do arroz.

Uma escolha apropriada da biomassa residual pode levar a uma melhor produção enzimática de acordo com o micro-organismo utilizado. Atualmente, há um aumento dos incentivos em pesquisas que busquem otimizações que aumentem a produção enzimática, a atividade enzimática e sua atividade residual, melhorando o custo-benefício de sua produção, visando à aplicação em diversos processos industriais. Sob esse aspecto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo, temperatura e teor de umidade sobre a produção das enzimas celulolíticas, endoglucanase e xilanase, durante a fermentação em estado sólido da casca de arroz, utilizando duas espécies fúngicas, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, bem como estudar simultaneamente o efeito do pH, tempo e temperatura sobre as condições de reação dessas enzimas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

A casca de arroz utilizada nos experimentos foi cedida pela Beneficiadora de Arroz Tio Mário, localizado em Barreiras na Região Oeste da Bahia. As cascas foram trituradas em um moinho de facas tipo Willey TE-650 TECNAL[®] (Piracicaba/São Paulo- Brasil), a uma granulometria em torno de 2,0 mm de diâmetro e armazenadas em recipientes de polietileno para realização das análises. Os micro-organismos utilizados para a fermentação foram *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* ambos doados pela Fundação Fiocruz.

2.2.2 Condições Experimentais

2.2.2.1 Preparo do inóculo *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*

Os micro-organismos foram mantidos em ágar batata inclinado entre 2 a 4°C e repicados a cada dois meses. Antes de cada experimento, os fungos filamentosos *A. niger* e *A. oryzae* foram cultivados em erlenmeyers contendo o meio sólido de PDA (Potato Dextrose Agar) durante 07 dias a 30°C em estufa bacteriológica (SOLAB modelo SL 101) para crescimento. O preparo do inóculo ocorreu através da adição de 20 ml de uma solução estéril de Tween 80 a 0,1% com auxílio de pérolas de vidro com diâmetro de 3 mm para raspagem dos esporos. A contagem do número de esporos presente nesta suspensão

foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer duplamente espelhada com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi ajustada para 10^7 esporos/g de resíduo sólido (NCUBE et al., 2012).

2.2.2.2 Bioprocesso – Fermentação em estado sólido

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL como biorreatores para o processo fermentativo tendo como meio de cultivo a casca de arroz. Foram pesados 10g do substrato e submetidos à esterilização em autoclave a 121°C e 1,0 atm. de pressão por 15 minutos. Após resfriamento, foi inoculada sobre o substrato a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/grama de resíduo. As fermentações foram conduzidas em estufas bacteriológicas B.O.D (Tabela 2.1 e 2.2). O cálculo do volume de água adicionado para se chegar às umidades desejadas foi realizado mediante o conteúdo de matéria seca do resíduo, através do determinador de umidade infravermelho MARTE ID200.

2.2.2.3 Extração da enzima

Para a obtenção dos extratos enzimáticos após o processo fermentativo da casca de arroz, foi adicionado em cada biorreator 100 ml de solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). Os extratos foram homogeneizados em um agitador rotatório a 30°C e 200 rpm por 30 minutos. A extração foi realizada por prensagem mecânica (filtração por pressão) para a obtenção do extrato bruto enzimático, o qual foi centrifugado a $15.115 \times g$ por 15 minutos em centrífuga (Heraeus Megafuge 16R) para remoção de sólidos mais finos, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (SANTOS et al., 2011(a)).

2.2.3 Determinação da atividade enzimática

2.2.3.1 Atividade de Carboximetilcelulase (endoglucanase)

A atividade da enzima CMCase (endoglucanase) foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação da carboximetilcelulose ou CMC (SIGMA) a 2% (p/v) diluído previamente na solução tampão citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 250 μ L de extrato enzimático e 250 μ L de CMC. Para o controle da reação foram adicionados 250 μ L da solução tampão citrato de sódio e 250 μ L de extrato enzimático. No branco da análise foi

adicionado 250 μL de CMC e 250 μL de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C durante 10 minutos e a interrupção da reação foi realizada com a adição de 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submersos em água fervente por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 5,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi medida na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto nas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

2.2.3.2 Celulases Totais (complexo endoglucanases e exoglucanases)

A atividade de celulases totais abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959) através dos açúcares redutores liberado pela degradação de uma tira de papel filtro Whatman nº1 (1,0 cm x 6,0 cm). Nos tubos reacionais foram adicionados 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM e 0,5 mL do extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Para o controle da reação foram adicionados 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, e no branco da análise foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS e todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto nas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

2.2.3.3 Atividade da Xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo MILLER (1959) através da liberação de açúcares redutores pela hidrólise da xilana. Nos tubos reacionais foram adicionados 125 μL de extrato enzimático e 125 μL de solução xilana 1% (SIGMA) diluída em tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM. Para o controle da reação, foram adicionados 125 μL da solução tampão citrato de sódio e 125 μL de extrato enzimático, enquanto no branco para zerar o espectrofotômetro foram adicionados 125 μL da solução tampão citrato de sódio e 125 μL de solução xilana 1%. Todas as amostras foram incubadas em banho-

maria a 50°C por 10 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 250 µL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto nas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

2.2.3.4 Cálculo para as atividades enzimáticas celulolíticas e xilanolíticas

A curva padrão para a endoglucanase e celulases totais foi constituída a partir da determinação de glicose (SIGMA) e a curva padrão para a xilanase foi obtida pela determinação de xilose (SIGMA), ambas nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do DNS (MILLER, 1959) com posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

2.2.4 Condições de reação enzimática

Os ensaios foram realizados conforme planejamento fatorial completo 2^3 , apresentado no item 2.2.5.3. A influência da temperatura, tempo de reação e pH sobre a atividade das enzimas estudadas foi avaliada no intervalo de 40 a 80°C, 30 a 150 min e pH 3 a 9 com o objetivo de encontrar a melhor condição de reação das enzimas agindo simultaneamente. Após o tempo de reação os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e a determinação da atividade enzimática seguiu conforme descrito anteriormente.

2.2.5 Planejamento Experimental

2.2.5.1 Triagem

Foi elaborado um planejamento fatorial completo 2^3 , cuja matriz está representada na Tabela 2.1 para avaliar três variáveis: temperatura, teor de umidade e tempo de fermentação, relacionadas com a produtividade enzimática. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis (+1 e -1) contando ainda com quatro repetições no ponto central

(nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, totalizando 12 ensaios, a partir da verificação dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR).

Tabela 2.1 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada na triagem para produção enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X_1	25	30	35
Tempo (horas) – X_2	24	72	120
Teor de umidade (%) – X_3	55	60	65

2.2.5.2 Otimização da produção enzimática.

A otimização da produção das enzimas foi realizada pelo delineamento fatorial 3^3 incompleto com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (BOX e BENHKEN, 1960), para determinar a condição ótima e o modelo empírico que correlaciona e eficiência das três variáveis. A partir da verificação dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR). A Tabela 2.2 informa os níveis e os valores correspondentes aos reais e codificados.

Tabela 2.2 - Variáveis codificadas e não codificadas do delineamento Box Benhken para a otimização das enzimas.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X_1	30	35	40
Tempo (horas) – X_2	96	144	192
Teor de umidade (%) – X_3	55	60	65

Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1), dados experimentais de coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla, onde β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , e β_{ijk} representa todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de X_i , e o efeito de interação entre X_i e X_j ; X_i , X_j e X_k sobre a atividade enzimática, respectivamente, e e é o erro do modelo.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k + e \quad (1)$$

A partir da análise de variância (ANOVA) a qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) por meio da significância de regressão, falta de ajuste e o coeficiente de determinação múltipla. Os efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o programa *Statistica versão 8.0* (STATSOFT 2007) e o *Sigma Plot versão 11.0* para analisar os dados experimentais.

2.2.5.3 Avaliação das condições de reação enzimática

Para se determinar as condições de reação das enzimas otimizadas foi elaborado um planejamento fatorial completo 2^3 , cuja matriz está representada na Tabela 2.3 para avaliar três variáveis: temperatura, pH e tempo de reação. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis (+1 e -1) contando ainda com quatro repetições no ponto central (nível zero), totalizando 12 ensaios. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para avaliar a atividade residual das enzimas submetidas a condições extremas.

Tabela 2.3 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada para as condições de reação enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X_1	40	60	80
pH – X_2	3	6	9
Tempo (min.)– X_3	30	90	150

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Determinação das condições de cultivo na casca de arroz pelos fungos *A. niger* e *A. oryzae*.

Estudo da produção enzimática pelo A. niger

Visando analisar a influência das variáveis independentes sobre a produção das enzimas pelo *A. niger* com a casca de arroz, foi realizada primeiramente uma triagem através do planejamento fatorial completo do tipo 2^3 . As variáveis estudadas foram temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade, definindo os mais significativos. A

Tabela 2.4 apresenta o planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase.

Tabela 2.4 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta		
	Temperatura	Tempo	Teor de Umidade	Atv. CMCase	Atv. FPASE	Atv. XILANASE
	°C	h	%	U/mL	U/mL	U/mL
1	25 (-1)	24 (-1)	55 (-1)	0,603	0,051	4,217
2	35 (+1)	24 (-1)	55 (-1)	0,883	0,116	4,869
3	25 (-1)	24 (-1)	65 (+1)	0,579	0,064	4,560
4	35 (+1)	24 (-1)	65 (+1)	0,986	0,143	4,813
5	25 (-1)	120 (+1)	55 (-1)	0,804	0,226	4,017
6	35 (+1)	120 (+1)	55 (-1)	0,783	0,175	3,986
7	25 (-1)	120 (+1)	65 (+1)	1,042	0,173	4,139
8	35 (+1)	120 (+1)	65 (+1)	1,086	0,265	4,562
9	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,638	0,184	4,456
10	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,625	0,186	4,319
11	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,696	0,197	4,415
12	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,600	0,239	4,634

A partir dos dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por *A. niger*.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus niger</i>					
Celulase total (FPASE)					
Modelo	1	0,02703	0,02703	13,44	0,004
Erro	10	0,02011	0,00201		
Falta de ajuste	7	0,01814	0,002592	3,94	0,144
Erro puro	3	0,001973	0,00066		
Total	11	0,04714			
R ²	0,5733				
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	6	0,2526	0,0421	1,77	0,273
Erro	5	0,1186	0,0237		
Falta de ajuste	2	0,1136	0,0568	34,34	0,009
Erro puro	3	0,0050	0,0017		
Total	11	0,3712			
R ²	0,6805				
Xilanase					
Modelo	3	0,7521	0,2507	7,82	0,0092
Erro	8	0,2565	0,0321		
Falta de ajuste	5	0,2044	0,0409	2,35	0,256
Erro puro	3	0,0521	0,01738		
Total	11	1,0086			
R ²	0,7500				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. FPASE (1,10)} = 4,96; F_{tab. CMCASE (6, 5)} = 4,95; F_{tab. XILANASE (3,8)} = 3,59.

De acordo com os resultados da ANOVA foi observado que para as enzimas celulase total e xilanase foi obtido um valor de F calculado maior que o valor de F tabelado, e a falta de ajuste não foram significativos, dessa forma, os modelos pode ser considerado estatisticamente significativo. Para enzima endoglucanase o valor de F calculado foi menor que o valor de F tabelado, no qual o modelo não é considerado

significativo e a falta de ajuste foi significativa indicando que o modelo utilizado não foi apropriado.

Através do gráfico de Pareto (Figura 2.1) podem ser visualizados de forma clara e rápida os fatores, traçados em ordem decrescente, que são estatisticamente significativos com 95% de confiança ($p = 0,05$) representada pela linha vertical tracejada.

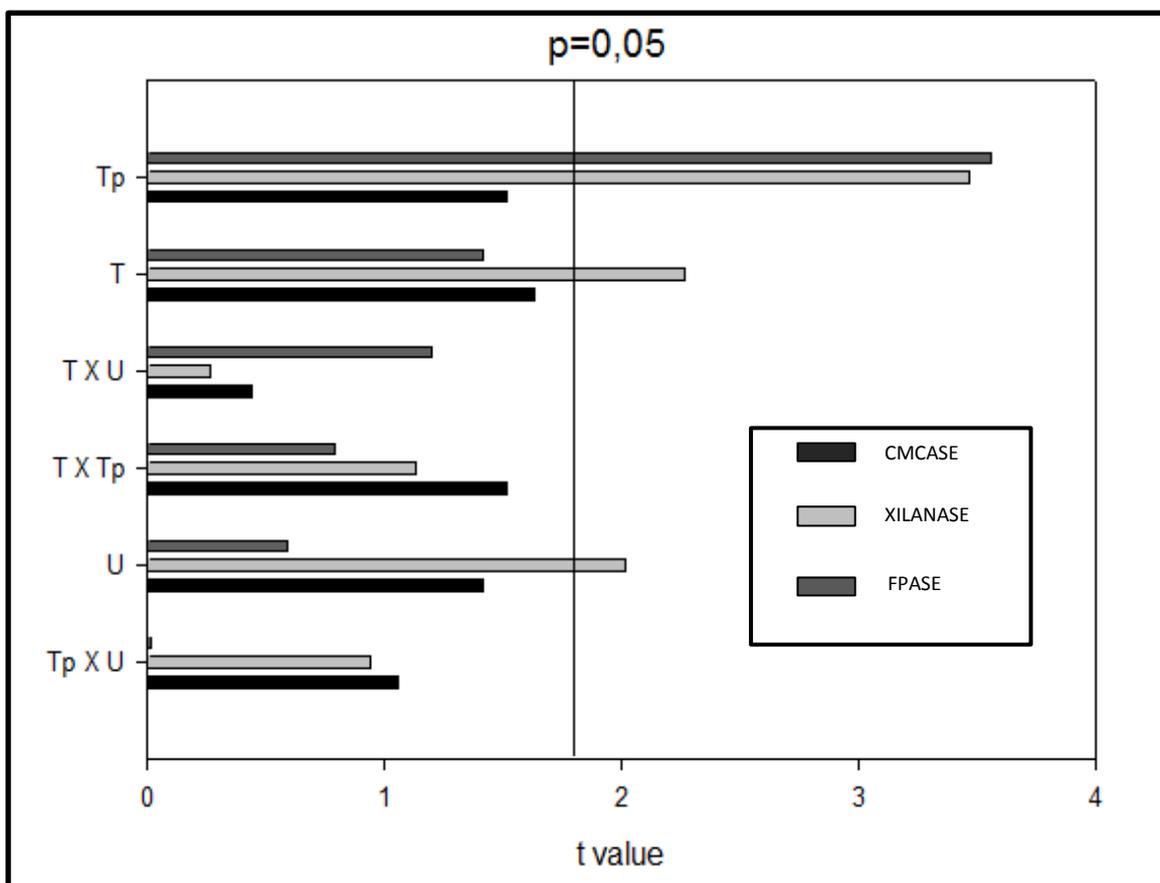


Figura 2.1 – Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus niger*.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 2.1) é possível observar que a variável tempo de fermentação foi significativo para a celulase total e xilanase. A temperatura e umidade apresentaram efeito significativo somente para a xilanase. Já para a enzima endoglucanase nenhum dos fatores foi significativo. Pode ser observado também que as interações entre as variáveis, tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade não foram significativas para nenhuma das enzimas avaliadas.

O planejamento fatorial foi utilizado apenas para a triagem das variáveis, sendo possível estabelecer a superfície de resposta para indicar a tendência a ser tomada na

otimização. Na Figura 2.2 são apresentadas as superfícies de resposta das atividades enzimáticas da celulase total e xilanase em função das variáveis significativas.

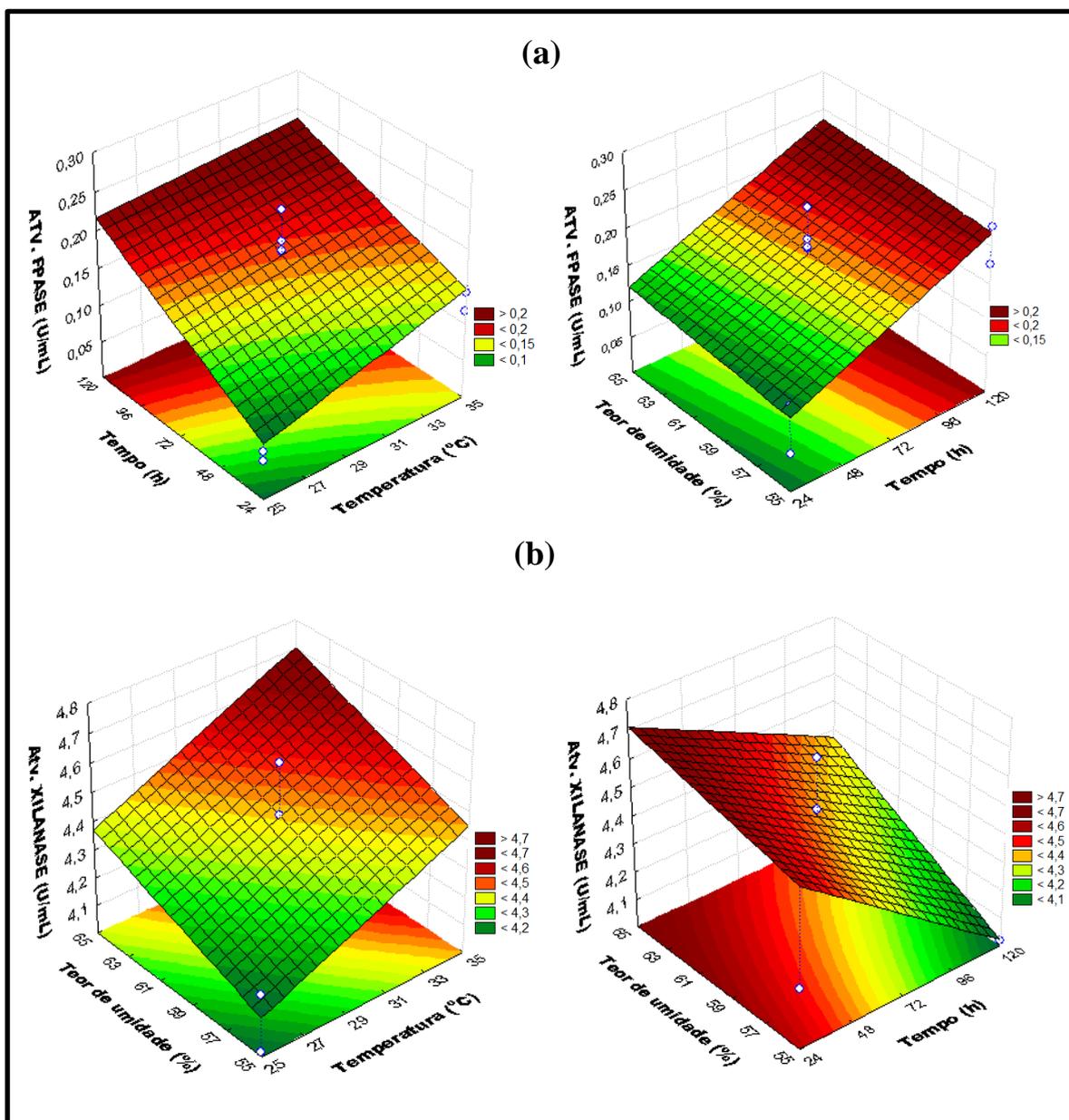


Figura 2.2 – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Celulase total (FPASE) produzida por *A. niger* na casca de arroz b) Xilanase produzida por *A. niger* na casca de arroz.

Embora a máxima produção encontra-se fora do domínio experimental, observa-se na Figura 2.2 (a) que o tempo de fermentação influenciou positivamente para a atividade da celulase total, ou seja, aumentando o tempo de fermentação, maiores valores da atividade enzimática são obtidas. Na Figura 2.2 (b) para uma melhor atividade da enzima xilanase, indicam uma tendência para valores mais elevados da temperatura e teor de umidade visto que estas variáveis influenciaram positivamente para a atividade enzimática.

Já o tempo de fermentação apresentou efeito significativo negativo, indicando que menor tempo de fermentação se obtém uma melhor atividade enzimática.

Estudo da produção enzimática pelo A. oryzae

Visando analisar a influência das variáveis independentes sobre a produção das enzimas pelo *A. oryzae* com a casca de arroz, foi realizada primeiramente uma triagem através do planejamento fatorial completo do tipo 2³. As variáveis estudadas foram temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade, definindo os mais significativos. A Tabela 2.6 apresenta o planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase.

Tabela 2.6 – Matriz do planejamento fatorial completo 2³ (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo *A. oryzae*.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta		
	Temperatura	Tempo	Teor de Umidade	Atv. CMCASE	Atv. FPASE	Atv. XILANASE
	°C	h	%	U/mL	U/mL	U/mL
1	25 (-1)	24 (-1)	55 (-1)	0,000	0,162	3,801
2	35 (+1)	24 (-1)	55 (-1)	0,130	0,221	4,182
3	25 (-1)	24 (-1)	65 (+1)	0,071	0,071	3,901
4	35 (+1)	24 (-1)	65 (+1)	0,208	0,202	4,360
5	25 (-1)	120 (+1)	55 (-1)	0,459	0,234	4,309
6	35 (+1)	120 (+1)	55 (-1)	0,695	0,210	3,905
7	25 (-1)	120 (+1)	65 (+1)	0,418	0,186	4,832
8	35 (+1)	120 (+1)	65 (+1)	0,669	0,184	5,387
9	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,326	0,285	4,495
10	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,385	0,280	4,830
11	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,392	0,300	4,483
12	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,326	0,265	4,844

A partir dos dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por *A. oryzae*.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus oryzae</i>					
Celulase total (FPASE)					
Modelo	6	0,0178	0,0030	0,55	0,756
Erro	5	0,0269	0,0054		
Falta de ajuste	2	0,0263	0,0131	63,16	0,003
Erro puro	3	0,0006	0,0002		
Total	11	0,0447			
R ²	0,3938				
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	4	0,50247	0,1256	132,4	<.0001
Erro	7	0,00664	0,00095		
Falta de ajuste	4	0,00271	0,00068	0,52	0,734
Erro puro	3	0,00393	0,00131		
Total	11	0,50911			
R ²	0,9870				
Xilanase					
Modelo	3	3,2873	1,0968	18,20	0,0006
Erro	8	0,4817	0,0602		
Falta de ajuste	5	0,3604	0,0721	1,78	0,336
Erro puro	3	0,1213	0,0404		
Total	11	3,7690			
R ²	0,8722				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. FPASE (6,5)} = 3,95; F_{tab. CMCASE (4,7)} = 4,12; F_{tab. XILANASE (3,8)} = 3,59.

De acordo com os resultados da ANOVA pode-se observar que para as enzimas endoglucanase e xilanase produzida por *A. oryzae*, o F calculado foi maior que o F tabelado conforme apresentado na tabela acima, a falta de ajuste para ambas as enzimas foi

não significativo e o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,987 e 0,872 respectivamente, confirmando que os modelos são bem ajustados aos valores experimentais.

Através do gráfico de Pareto (Figura 2.3) podem ser visualizados de forma clara e rápida os fatores, traçados em ordem decrescente, que são estatisticamente significativos com 95% de confiança ($p = 0,05$) representada pela linha vertical tracejada.

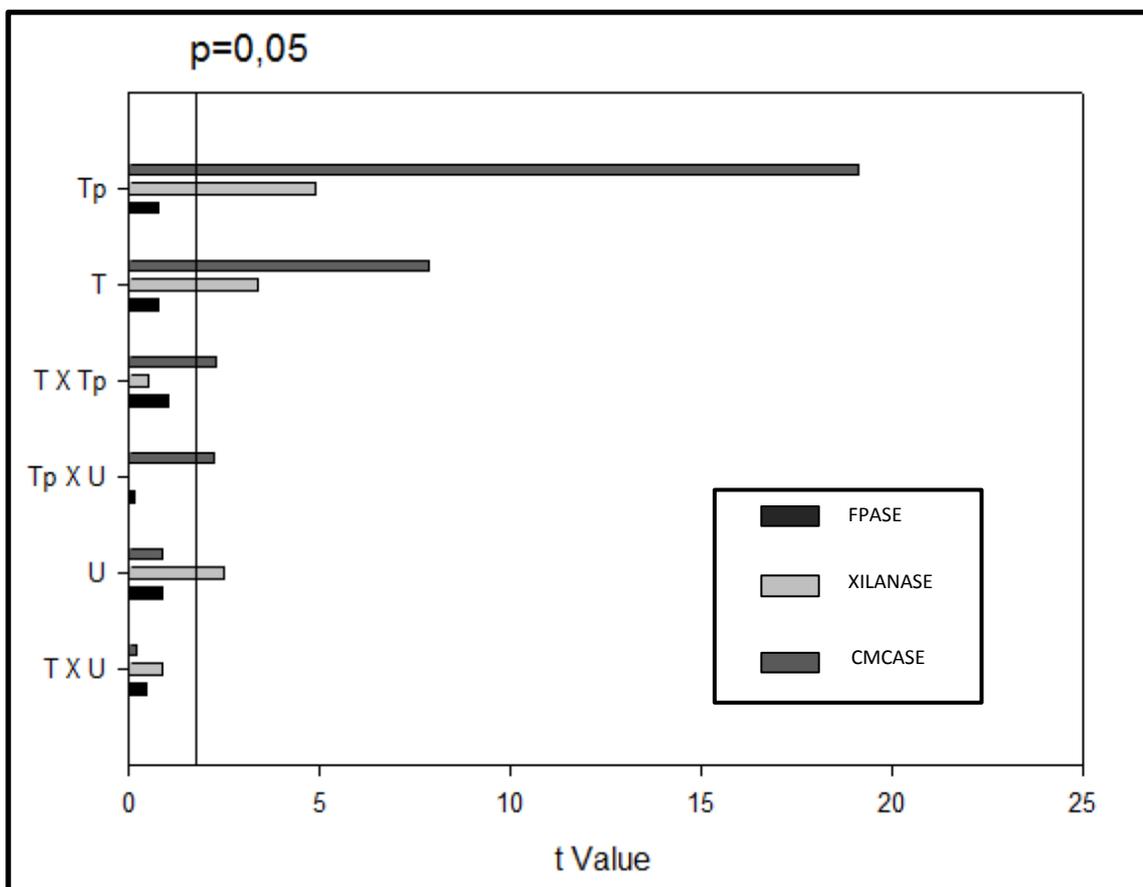


Figura 2.3 – Gráfico de Pareto da atividade enzimática da celulase total (FPASE), endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.

Conforme com o gráfico de Pareto (Figura 2.3) é possível observar que as variáveis, tempo de fermentação e temperatura possuem um efeito significativo para a endoglucanase e xilanase. A variável umidade foi significativa somente para a enzima xilanase. E as interações para a variável temperatura, tempo de fermentação e umidade foram significativas somente para a endoglucanase. E não houve nenhum efeito significativo para a enzima celulase total.

O planejamento fatorial foi utilizado apenas para a triagem das variáveis, sendo possível estabelecer a superfície de resposta para indicar a tendência a ser tomada na

otimização. Na Figura 2.4 são apresentadas as superfícies de resposta das atividades enzimáticas da endoglucanase e xilanase em função das variáveis significativas.

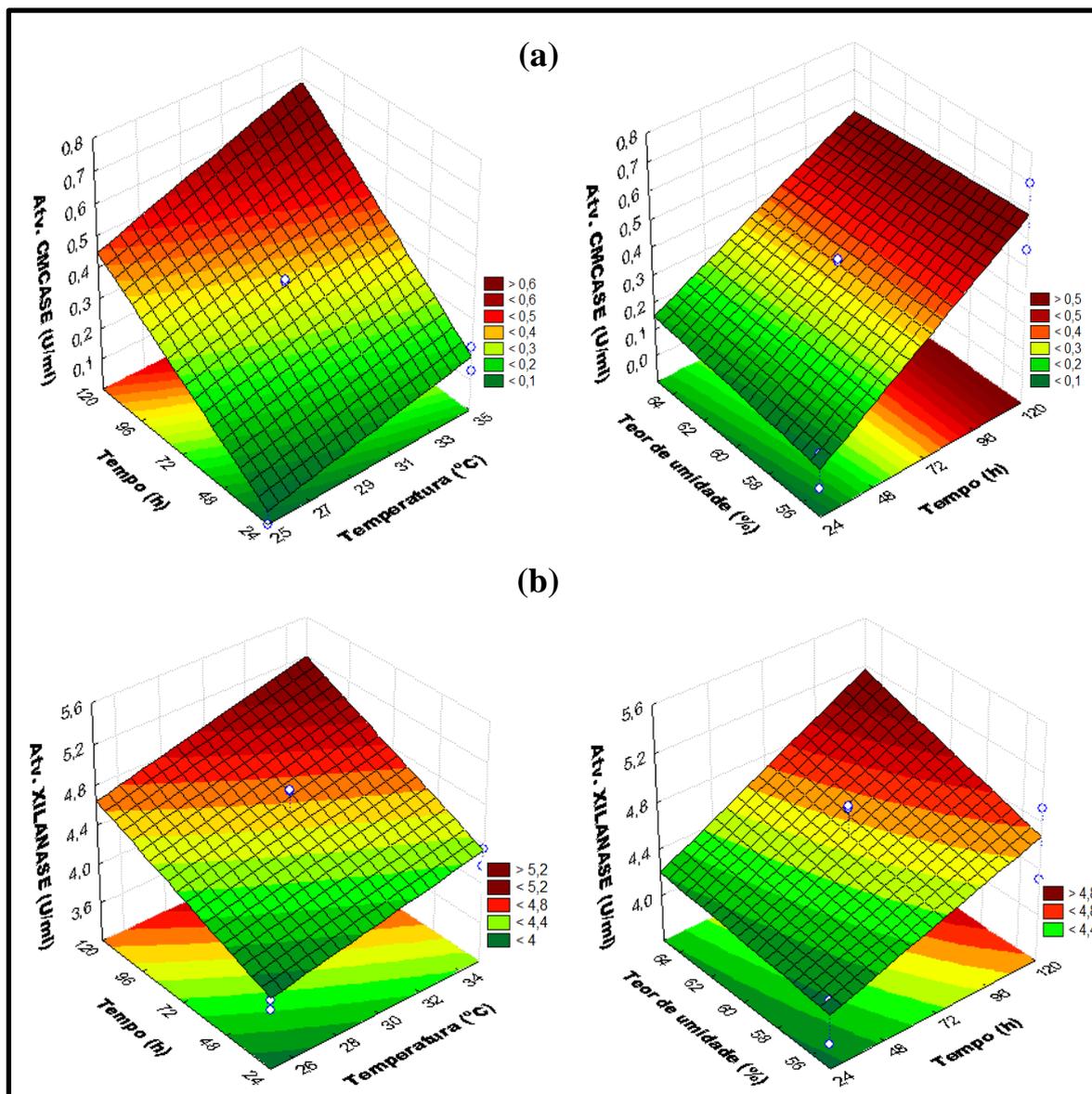


Figura 2.4 – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Endoglucanase (CMCANE) produzida por *A. oryzae* na casca de arroz b) Xilanase produzida por *A. oryzae* na casca de arroz.

Embora a máxima produção encontra-se fora do domínio experimental, observa-se na Figura 2.4 (a) que uma maior atividade da enzima endoglucanase é alcançada com o aumento do tempo de fermentação e aplicação de temperaturas mais elevadas, ambas variáveis influenciaram positivamente para a atividade dessa enzima. Através da análise da Figura 2.4 (b), mostra que todas as três variáveis, temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade exerceram um efeito positivo significativo sobre a resposta, ou seja, aumentando o valor destes parâmetros maiores a atividade da xilanase é obtida.

Dentre as variáveis avaliadas no planejamento fatorial é possível afirmar que o tempo de fermentação e temperatura foram os fatores predominantes que influenciaram na produção das enzimas tanto pelo *A. niger* como pelo *A. oryzae*. Apesar do teor de umidade não ter sido significativa em um intervalo de confiança de 95% para a celulase total e endoglucanase, essa variável exerce influência sobre a atividade enzimática.

Conforme os resultados obtidos na triagem, o fungo filamentososo *A. niger* apesar de ter obtido valores de atividade enzimática próximos ao *A. oryzae*, apresentou dificuldades para crescimento na casca de arroz, sendo necessária a realização de mais repetições, inviabilizando dessa forma a continuidade de sua utilização na etapa de otimização. E comparando-se a proporção da variação explicada entre os dois fungos, isto é, pela análise do coeficiente de determinação ajustada (R^2), baseado na análise de variância (ANOVA), o fungo *A. oryzae* foi o selecionado visto que as enzimas produzidas, endoglucanase e xilanase, obteve melhor resposta em relação ao *A. niger*.

2.3.2 Otimização das condições de cultivo na produção das enzimas endoglucanase e xilanase pelo fungo *A. oryzae*.

Para o estudo de otimização da produção das enzimas endoglucanase e xilanase, realizou-se um Delineamento Box Behnken com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental visando maximizar a produção enzimática. Dessa forma, foi realizado um deslocamento dos valores para as variáveis: tempo de fermentação e temperatura, visto que ambas apresentaram uma tendência para valores mais elevados. Para o teor de umidade foi mantido os mesmos valores. O objetivo do deslocamento consiste em alterar os níveis das variáveis em estudo de modo a aumentar a resposta de interesse até atingir um ponto ótimo (ZHUANG et al., 2006).

A Tabela 2.8 apresenta a matriz do delineamento Box Behnken (DBB) com os valores reais, codificados e as respostas para a endoglucanase e xilanase.

Tabela 2.8 – Matriz do DBB (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta	
	Temperatura °C	Tempo h	Teor de Umidade %	Atv. CMCASE U/mL	Atv. XILANASE U/mL
1	30 (-1)	96 (-1)	60 (0)	1,464	9,353
2	40 (+1)	96 (-1)	60 (0)	0,955	4,572

3	30 (-1)	192 (+1)	60 (0)	1,307	8,131
4	40 (+1)	192 (+1)	60 (0)	0,893	3,262
5	30 (-1)	144 (0)	55 (-1)	1,527	10,261
6	40 (+1)	144 (0)	55 (-1)	1,245	5,841
7	30 (-1)	144 (0)	65 (+1)	1,423	9,660
8	40 (+1)	144 (0)	65 (+1)	1,216	5,721
9	35 (0)	96 (-1)	55 (-1)	1,324	5,934
10	35 (0)	192 (+1)	55 (-1)	1,415	6,736
11	35 (0)	96 (-1)	65 (+1)	1,270	8,124
12	35 (0)	192 (+1)	65 (+1)	0,971	5,974
13	35 (0)	144 (0)	60 (0)	1,688	8,967
14	35 (0)	144 (0)	60 (0)	1,858	9,287
15	35 (0)	144 (0)	60 (0)	1,622	8,873

Uma análise preliminar desta tabela permite verificar que a condição experimental favoreceu em maiores resultados das atividades enzimáticas. A partir dos dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - ANOVA para as atividades enzimáticas da endoglucanase e xilanase do DBB produzidas por *A. oryzae*.

	GL	SQ	QM	F	P
<i>Aspergillus oryzae</i>					
Endoglucanase (CMC_{AS})					
Modelo	6	0,9347	0,1557	11,17	0,0016
Erro	8	0,1115	0,0139		
Falta de ajuste	6	0,0819	0,0136	0,92	0,6042
Erro puro	2	0,0296	0,0148		
Total	14	1,0462			
R ²	0,8934				
Xilanase					
Modelo	5	59,5517	11,9103	60,16	<.0,001
Erro	9	1,7816	0,1979		
Falta de ajuste	7	1,6874	0,2410	5,12	0,1732
Erro puro	2	0,0942	0,0471		

Total	14	61,3333
R ²	0,9710	

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. CMCASE (6,8)} = 3,58; F_{tab. XILANASE (5,9)} = 3,48.

Pela ANOVA constatou-se que a variação devido aos parâmetros da regressão de ambos os modelos polinomiais para a enzima endoglucanase e xilanase foram estatisticamente significativas no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), ou seja, F calculado foi maior que o F tabelado, mostrando um valor ajustado de coeficiente de determinação de 0,8934 e 0,9710, ou seja, com 89,34 e 97,1% da variação explicada para endoglucanase e xilanase, respectivamente, existindo uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos do modelo.

A falta de ajuste não foi significativa e sugere que a equação do modelo foi adequada para prever a atividade da endoglucanase e xilanase sob quaisquer conjuntos de combinação das variáveis. O resultado da ANOVA pode ser visualizado no diagrama de pareto (Figura 2.5) que demonstra a significância das variáveis estudadas na constituição do modelo matemático, onde cada elemento é traçado em ordem decrescente.

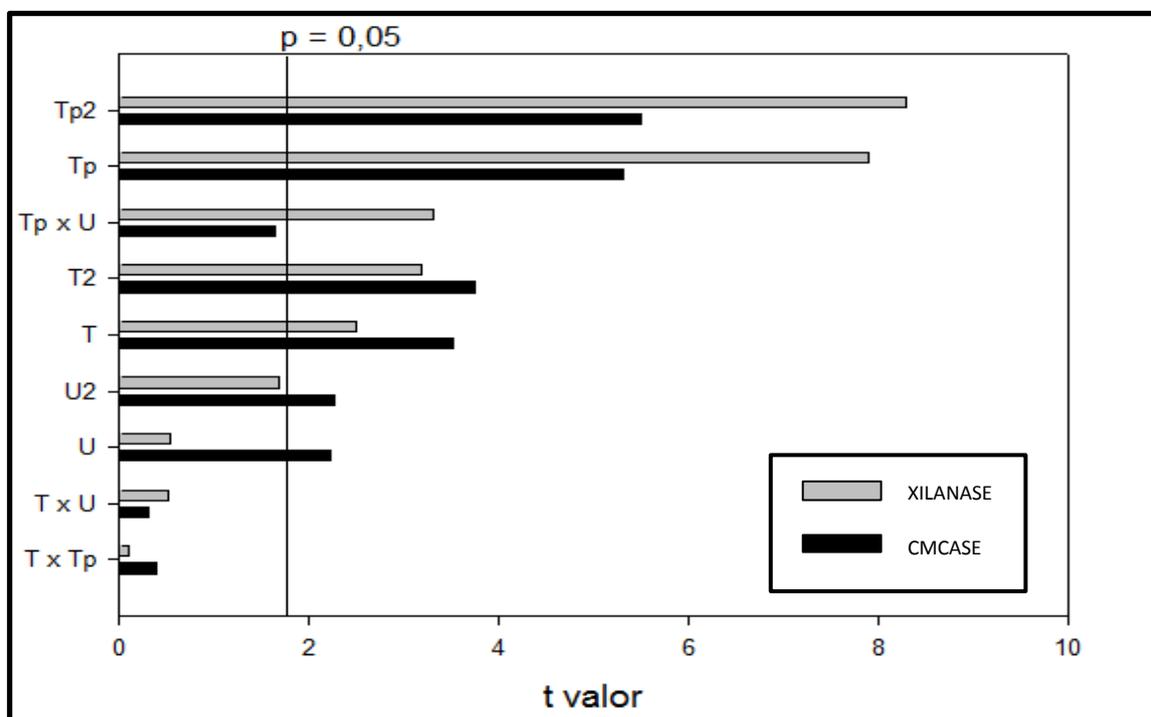


Figura 2.5 – Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.

A partir dos dados apresentados no gráfico de pareto (Figura 2.5) é possível visualizar que as duas variáveis mais significativas para a produção das enzimas endoglucanase e xilanase foram o tempo de fermentação e a temperatura. O teor de umidade foi significativo somente para a produção da endoglucanase.

Os modelos reduzidos obtidos para prever as atividades enzimáticas em função das variáveis estão representados pelas equações (2) e (3), em termos de valores não codificados.

$$AE_{XILANASE} = -27,291 + 1,610T + 0,229T_p - 0,029T^2 - 0,00083 T_p^2 - 0,738 T_p \times U \quad (2)$$

$$AE_{CMC\text{ASE}} = -30,386 + 0,6090T + 0,0411T_p + 0,6554U - 0,0092T^2 - 0,00015T_p^2 - 0,0056U^2 \quad (3)$$

Onde, AE é a atividade enzimática, T é temperatura, T_p é o tempo de fermentação e U é o teor de umidade.

A superfície de resposta foi gerada a partir dos modelos matemáticos (Eq. (2 e 3)) com base nas variáveis independentes, temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade e está representada na Figura 2.6.

As condições ótimas para a produção da endoglucanase observadas na Figura 2.6 (coluna A) são no tempo de 141,5 horas, na temperatura de 33°C e com um teor de umidade de 58,5 %. Nestas condições, a atividade máxima da endoglucanase prevista pelo modelo foi de 1,77 U/mL, muito próximo ao valor real obtido de 1,72 U/mL.

Para a enzima xilanase as condições ótimas representada na Figura 2.6 (coluna B) foi no tempo de 137 horas na temperatura de 30°C com 60% de umidade. Como a umidade não foi significativa vale ressaltar que o *Aspergillus oryzae* produziu a enzima utilizando a casca de arroz em toda a faixa de umidade estudada de 55, 60 e 65%. Nessas condições, a atividade máxima da xilanase prevista pelo modelo foi de 10,6 U/mL, próximo ao valor real obtido de 9,03 U/ml.

Conforme demonstrado na Figura 2.6, a influência significativa do tempo de fermentação para a produção enzimática foi em um intervalo de 130 a 150 horas para as atividades enzimáticas da endoglucanase e xilanase. O que pode ter contribuído para esta ocorrência é a presença de nutrientes na biomassa utilizada durante a fermentação contribuindo para o crescimento microbiano e a síntese enzimática, à medida que os microorganismos vão consumindo os nutrientes e ocorrendo o esgotamento destes, há conseqüentemente a diminuição da produção microbiana e por fim o declínio da produção

enzimática que pode ser visualizada a partir de 150 horas de fermentação. Santos et al (2013) e Biazus et al (2006) também observaram que a produção de enzimas a princípio é lenta, acelerando até alcançar o seu valor máximo em um dado momento e por fim a redução da atividade.

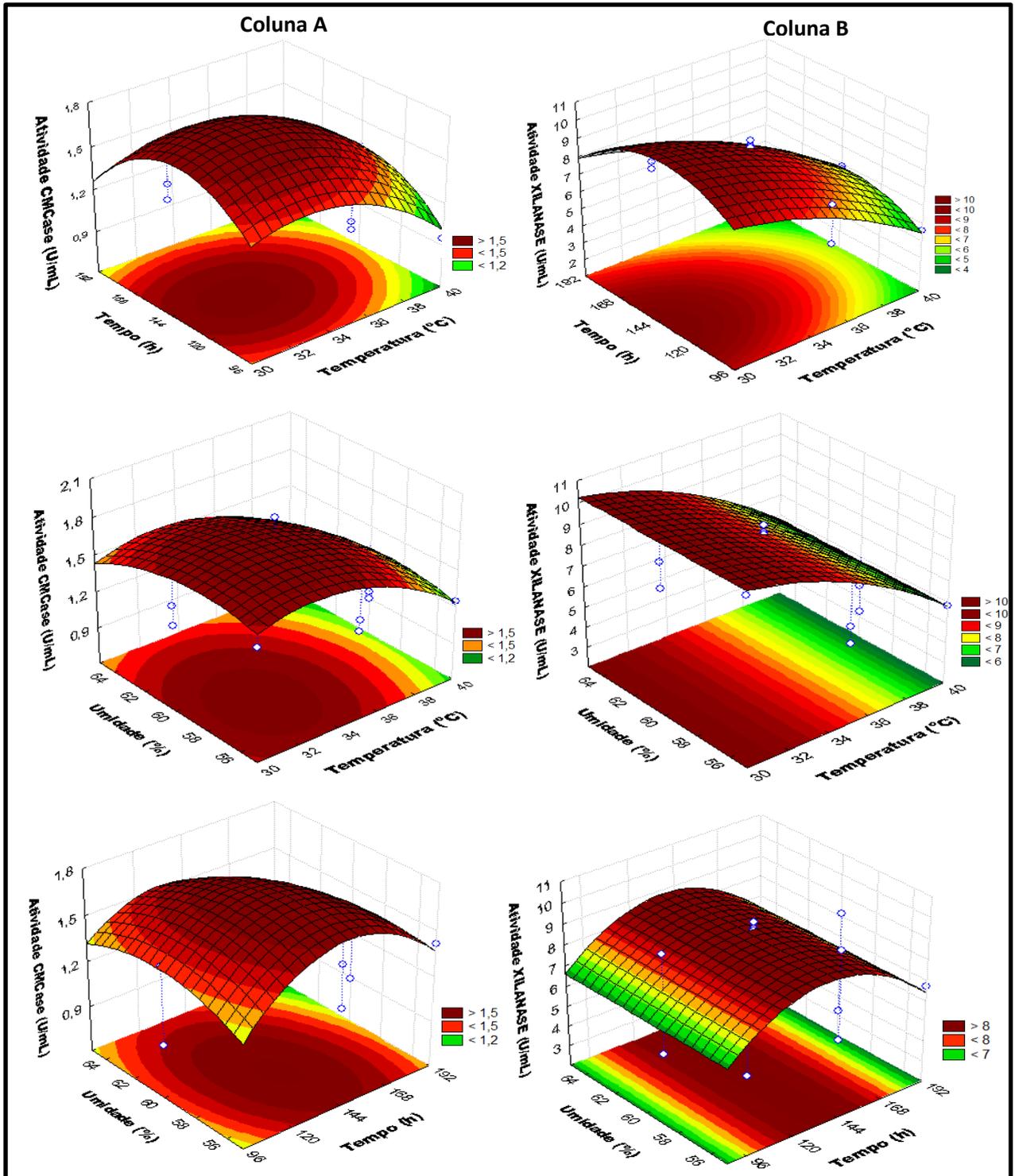


Figura 2.6 – Superfície de resposta dos modelos ajustados: coluna (A) endoglucanase (CMCase); coluna (B) Xilanase.

A temperatura é um fator crítico, sendo uma das variáveis que mais afeta a fermentação em estado sólido, estando relacionada com o transporte de massa e com a transferência de oxigênio, influenciando o crescimento do micro-organismo, a formação de esporos e conseqüentemente com a produção das enzimas (WANG, YANG 2007; PANDEY, 2003). De acordo com a Figura 2.6 a influência significativa para a temperatura foi em torno de 30 a 33°C para a produção da atividade enzimática da xilanase e endoglucanase, em consequência dos fungos filamentosos possuem atividades metabólicas mesófilas, com o crescimento associado a temperaturas entre 25 e 35°C, fato também observado nos estudos de Santos et al (2011) e Singhania e colaboradores (2006). A partir de 35°C houve redução na produção enzimática, de forma que a temperatura mais elevada pode ter inativado o fungo impedindo o seu crescimento e a produção enzimática.

Vale salientar que durante o processo fermentativo o fungo sintetizou a enzima tendo como indutores somente a casca de arroz e água.

2.3.3 Estudo das condições de reação das enzimas endoglucanase e xilanase produzidas por *A. oryzae*.

Para as condições de reação das enzimas foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^3 para as variáveis temperatura, tempo de incubação e pH, avaliando a resposta da atividade residual. A Tabela 2.10 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores reais, codificados e as respostas residuais da atividade enzimática da endoglucanase e xilanase.

Tabela 2.10 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas do % da atividade enzimática residual da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta	
	Temperatura °C	Tempo h	pH	Atv. CMCase % residual	Atv. XILANASE % residual
1	40 (-1)	30 (-1)	3 (-1)	62,597	53,499
2	80 (+1)	30 (-1)	3 (-1)	45,883	18,025
3	40 (-1)	30 (-1)	9 (+1)	57, 236	91,542
4	80 (+1)	30 (-1)	9 (+1)	43,044	17,152
5	40 (-1)	150 (+1)	3 (-1)	53,344	54,628

6	80 (+1)	150 (+1)	3 (-1)	52,505	17,819
7	40 (-1)	150 (+1)	9 (+1)	56,605	82,350
8	80 (+1)	150 (+1)	9 (+1)	43,990	16,177
9	60 (0)	90 (0)	6 (0)	67,958	22,388
10	60 (0)	90 (0)	6 (0)	65,751	21,926
11	60 (0)	90 (0)	6 (0)	63,228	21,670
12	60 (0)	90 (0)	6 (0)	63,543	24,031

A partir dos dados obtidos das condições de reação enzimática no presente estudado, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2.11.

Tabela 2.11 - ANOVA para a atividade enzimática residual da endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial completo 2^3 .

	GL	SQ	QM	F	P
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	1	335,049	335,049	9,60	0,0006
Erro	10	481,991	48,199		
Total	11	817,04			
R ²	0,4108				
Xilanase					
Modelo	4	6787,7	1696,9	6,95	0,001
Erro	7	1237,2	176,7		
Total	11	8024,9			
R ²	0,8458				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. CMCASE (1,10)} = 4,96; F_{tab. XILANASE (4,7)} = 4,12.

A partir da ANOVA foi observado que para as enzimas endoglucanase e xilanase foi obtido um valor de F calculado maior que o valor de F tabelado, dessa forma, os modelos pode ser considerado estatisticamente significativo.

Os efeitos de temperatura, tempo e pH da atividade enzimática são fundamentais para se entender o comportamento enzimático e possivelmente determinar suas melhores condições de trabalho em diversos segmentos industriais. Os dados da tabela anterior foram utilizados para a construção do gráfico de Pareto na Figura 2.7.

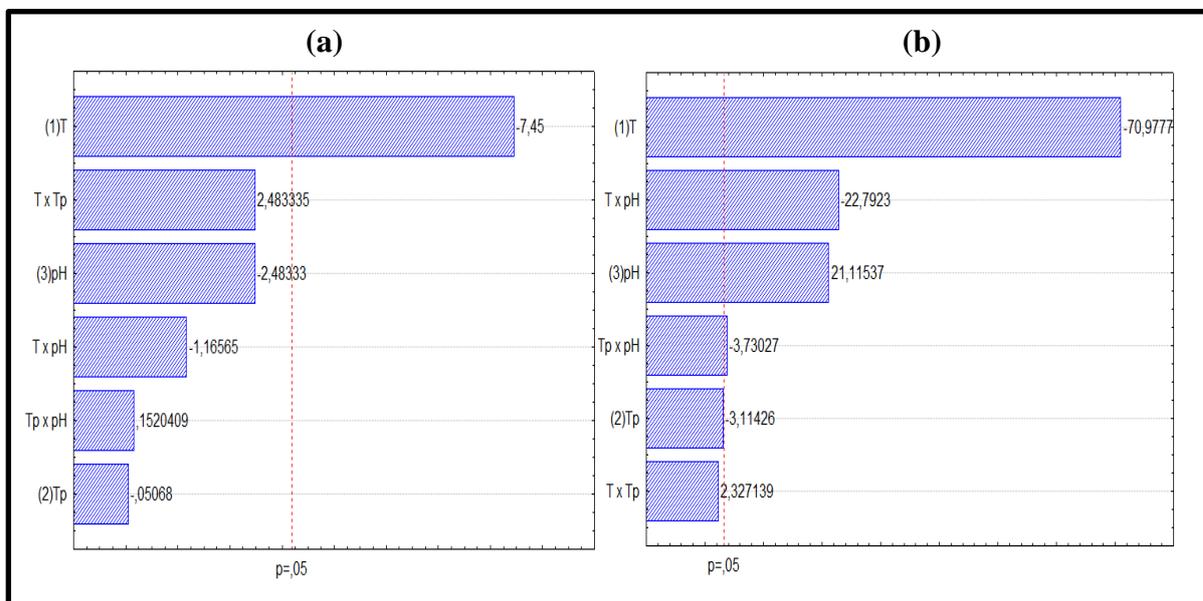


Figura 2.7 - Gráfico de Pareto da caracterização enzimática: a) endoglucanase; b) xilanase.

A temperatura apresentou um efeito significativo negativo em ambas às enzimas (Figura 2.7), entretanto o efeito é superior para a enzima xilanase, indicando que menores temperaturas são mais favoráveis. O pH apresentou efeito significativo positivo para a xilanase, assim pode-se deduzir que maiores atividade residual da enzima pode ser mantida quando aplicados simultaneamente temperaturas mais baixas com pH mais elevado. Apesar de não ter efeito estatisticamente significativo, a interferência do tempo de incubação é negativo para as enzimas. Dessa forma, verificou-se que a melhor condição para a atividade residual da enzima endoglucanase encontra-se dentre os valores estudados no ponto central da Tabela 2.8. Para a xilanase o ensaio 3 na Tabela 2.8 mostra os melhores condições com 91% da atividade residual.

Na Figura 2.8 são apresentadas as superfícies de resposta da atividade residual enzimática da endoglucanase e xilanase em função das variáveis para uma melhor visualização dos efeitos em concordância com os gráficos de pareto acima.

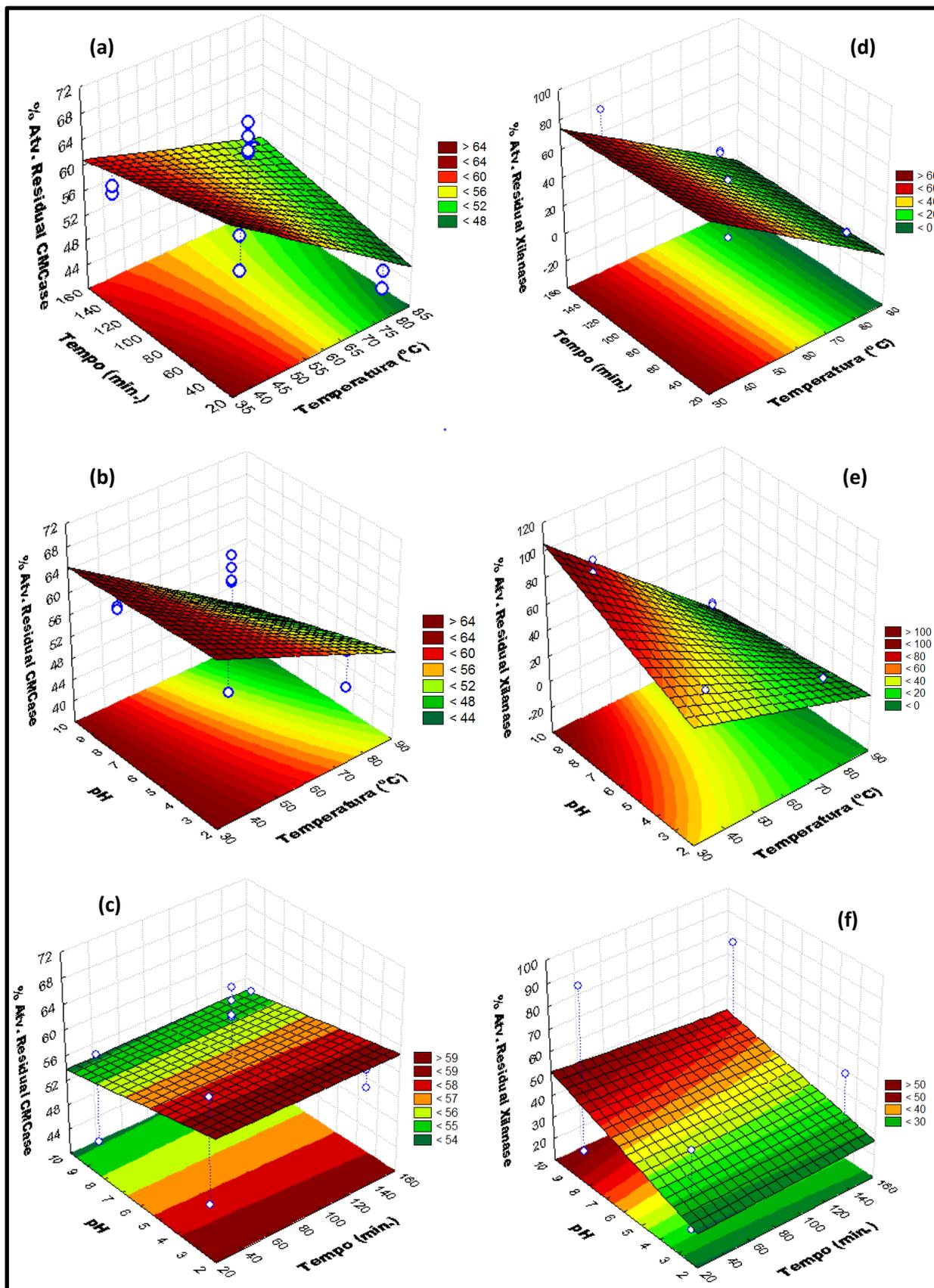


Figura 2.8 – Estabilidade enzimática ao pH, temperatura e tempo de incubação: a, b, c) endoglucanase – CMCase; d, e, f) xilanase produzidas por *A. oryzae*.

Para a enzima endoglucanase, a Figura 2.8 (a) demonstra que na interação entre a temperatura e o tempo de reação para aplicação industrial, até 50°C a enzima mantém uma atividade residual em torno de 64% por 150 minutos de incubação, com temperaturas superiores reduz drasticamente a atividade enzimática. Na Figura 2.8 (b), na interação do pH e temperatura, observa-se que ao trabalhar com temperatura em 50°C a enzima se mantém estável em ampla faixa de pH (3 a 9) com aproximadamente 64% da atividade residual. E por fim a Figura 2.8 (c) indica com um pH até 5,0 a enzima continua estável por 150 minutos de incubação em aproximadamente 60% da atividade residual, aumentando o pH ocorre a redução da atividade enzimática. Portanto a aplicabilidade das três variáveis em conjunto para uma atividade residual por volta de 60%, deve-se utilizar a temperatura até 50°C com pH até 5,0 para que se mantenha estável em 150 minutos de incubação.

Nos estudos realizados por Narra et al (2014) a endoglucanase de *A. terreus* se manteve ativa ao longo de um intervalo de pH de 3,6 a 5,0 e a enzima manteve 99% da sua atividade máxima após 150 minutos de incubação a 50°C, sendo superior a encontrada neste trabalho. A partir de 60°C reteve 90% da atividade durante 1 hora e 75% em 2 horas, depois houve perda da atividade. A enzima foi rapidamente inativada a 70°C e manteve a atividade de apenas 10% após 30 minutos de incubação.

Pesquisas realizadas por Song e Wei (2010) caracterizaram as endoglucanases produzidas por *Cellulosimicrobium cellulans* em relação à estabilidade ao pH, as quais tiveram uma perda de 50% da sua atividade máxima em pH 5,0 sendo incubadas por uma hora no tampão correspondente, atividade residual menor e tempo inferior ao encontrado neste trabalho com a mesma faixa de pH estudada. Já Huang e colaboradores (2012) produziram uma endoglucanase por *Bacillus sp.* estável em relação ao pH, mantendo atividade residual acima de 85% para valores de pH entre 4,0 e 7,0, sendo o pH 5,0, aquele que proporcionou maior atividade residual.

Oliveira et al. (2013) verificaram que endoglucanase produzida por *H. grisea* manteve 88% da sua atividade após 240 minutos de incubação a 50, 60 e 70° C. No actinomicato *Streptomyces drozdowiczii*, o extrato bruto contendo endoglucanase demonstrou estabilidade térmica ao longo de uma hora e meia a temperatura de 50°C, no mesmo período, 100% de atividade foi reduzida a 60°C (LIMA et al, 2005).

Endoglucanases produzidas por *Aspergillus fumigatus* Z5 em estudo realizado por Liu e colaboradores (2011) apresentaram atividade enzimática residual acima de 80% em

uma faixa temperaturas de 40 – 60°C, no qual foram obtidos maiores valores comparado ao presente estudo.

Para a enzima xilanase na Figura 2.8 (d) observa-se que na interação entre a temperatura e o tempo de incubação para aplicação industrial, até 50°C a enzima mantém uma atividade enzimática residual em torno de 60% por até 150 minutos de incubação, com temperaturas superiores reduz drasticamente a atividade enzimática. A Figura 2.8 (e) mostra que a enzima mantém uma atividade residual em torno de 80% quando aplicado temperatura de até 40°C com um pH entre 5 e 9, se aumentar a temperatura e/ou diminuir o valor do pH ocorre uma redução da atividade residual enzimática. Na interação do pH com o tempo de incubação demonstrado na Figura 2.8 (f), ao se trabalhar com pH acima de 7,0 a enzima mantém uma atividade residual em torno de 50% por um tempo de 150 minutos, no entanto, ao se utilizar valores de pH abaixo da neutralidade, há perdas da atividade enzimática. Dessa maneira, pode-se concluir que a melhor resposta é obtida há temperaturas inferiores de 50°C com pH na faixa de 6 a 9 ficando estável por até 150 minutos.

Comportamento semelhante ao observado neste trabalho para as condições de reação ao pH da xilanase, nos estudos realizados por Gong et al (2013), a enzima manteve a atividade quando incubada em uma faixa de pH entre 5,5 e 8,5. Verma et al (2013) estudaram uma xilanase estável em pH alcalino e termoestável, que apresentou ampla atividade entre pH 6 e 12, com valor ótimo em 9, com mais de 55 % de atividade residual em pH 10.

A xilanase termoestável de *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 estudada por Anand et al (2013) se apresentou estável entre pH 5 e 8, com mais de 40 % da atividade residual e ponto ótimo em 7,5. Já kaushik et al (2014) nos estudos da produção de xilanase com *Aspergillus lentulus* obteve uma maior atividade residual da enzima a pH 5,0 mantendo 92% da sua atividade, a atividade da enzima também foi testada em pH alcalino obtendo uma redução acentuada de 38,5% em pH 10. No entanto foi observada ainda a atividade da xilanase com 77, 2 % e 59,1% quando mantidas em pH 8 e 9 respectivamente, a qual é predominante durante o processo de branqueamento da polpa de celulose, mantendo uma boa estabilidade depois de 3 horas de incubação.

Guo et al (2013), mostraram que as maiores atividades ocorreram em pH 6 e 7 para a xilanase de *Glaciecola mesophila* KMM241, mas a enzima se mostrou com maior atividade residual entre os valores de 6 a 10, retendo mais de 80% de sua atividade após a

incubação por 1 hora nos respectivos valores de pH. Normalmente, xilanase microbianas são estáveis ao longo de uma ampla gama de pH 3,0-10,0 (Kulkarni et al., 1999).

Para a termoestabilidade da xilanase, alguns relatos na literatura indicam que a enzima possui maior atividade residual a 50°C retendo a atividade em torno de 85,4%, mesmo após 60 min de incubação (Kaushik et al., 2014). Kronbauer et al (2007) testou a estabilidade térmica da xilanase produzida por *Aspergillus casei* incubando-as nas temperaturas de 45, 50 e 55°C durante 90 minutos e observou que a atividade xilanolítica a 45°C manteve-se praticamente estável com perda de apenas 18% da atividade residual aos 90 minutos de reação. A enzima também mostrou meia-vida de 50 minutos na temperatura de 50°C, a qual diminuiu para 17 minutos quando incubada a 55°C, tempo inferior ao encontrado neste trabalho.

Panwar, et al (2014) obtiveram resultados para a atividade residual da xilanase produzida por *Bacillus sp*, num intervalo de 45 - 60°C com 75% da atividade enzimática mantida. E Chi et al (2013) manteve a atividade residual da xilanase em 100% e 75% após duas horas de incubação a temperaturas de 55 e 60°C, respectivamente.

Em todos os trabalhos citados anteriormente, os estudos das condições de reação ao pH, temperatura e tempos de atuação foram realizados separadamente, podendo não correlacionar os fatores com a realidade dos processos industriais, visto que em diversos segmentos, seja na indústria alimentícia, ração animal, papel e celulose, dentre outros, a fabricação pode envolver numa mesma operação temperaturas, pH e o tempo de produção, no qual a enzima ou um complexo multienzimático atuará. Dessa forma, precisa-se ter conhecimento das interações desses fatores simultaneamente, pois uma variável pode influenciar a outra podendo propiciar uma maior atividade residual da enzima, como também pode causar uma redução drástica da atividade, inativando a enzima e impedimento sua aplicabilidade industrial. Dessa forma, este trabalho propôs o estudo das condições de reação numa ampla faixa de pH, aplicando diferentes temperaturas e tempo de reação com o propósito de avaliar o comportamento dessas variáveis sobre a manutenção da atividade enzimática que é de grande interesse para aplicação industrial desses biocatalisadores.

A alta temperatura é um pré-requisito na maioria dos processos industriais, portanto, a utilização da xilanase e endoglucanase produzidas por *A. oryzae* mantendo uma boa atividade residual enzimática a 50°C, como também foi visto nos trabalhos relatados, parece ser um candidato adequado para sua utilização.

As xilanase alcalinas, por sua vez, são úteis no processamento do amido, atuando como enzimas adicionais (ZHANG; XING; LIU, 2004) e no branqueamento da polpa de papel (TECHAPUN et al., 2003). De acordo com a literatura grande parte das celulases apresentam pH ótimo dentro da faixa ácida sendo aplicados no processo de clarificação de suco de frutas, no acabamento de tecidos como na lavagem do Jeans entre outros (ZHAO et al., 2012). Desta forma, o *A. oryzae* pode ser considerado como um micro-organismo interessante na produção de xilanases e endoglucanase microbianas, devido à versatilidade de seu sistema enzimático.

2.4 CONCLUSÃO

Não houve bom crescimento do fungo *A. niger* na casca de arroz quando comparado com o *A. oryzae*.

A produção das enzimas endoglucanase e xilanase durante a fermentação em estado sólido da casca de arroz, com auxílio do fungo *A. oryzae* foi otimizada, destacamos que nenhum macro ou micronutrientes foram adicionados durante o processo.

Para a enzima celulase total (FPASE) não houve produção enzimática satisfatória com os valores das variáveis otimizadas.

O estudo das condições de reação das enzimas endoglucanase e xilanase, presente no extrato multienzimático, avaliou o tempo de reação, temperatura e pH através do planejamento fatorial completo 2^3 e a metodologia de superfície de resposta, os resultados obtidos pode direcionar a aplicação das enzimas em diferentes processos industriais, como na produção de alimentos, na fabricação de detergentes, nas indústrias têxteis, ração animal, entre outros.

2.5 AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2.6 REFERÊNCIAS

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil

palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.48, p.1293-1302, 2013.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v.7, p.163-173, 2014.

BAJAJ, B. K.; KHAJURIA, Y. P.; SINGH, V. P. Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, p.314-320, 2012.

BAJAJ, B. K.; PANGOTRA, H.; WANI, M. A.; SHARMA, P.; SHARMA, A. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus strain* M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**, v.16, p.382-387, 2009.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modelling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal Food Engineering**, v.78, p.836–845, 2007.

BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.787-792, 2006.

BON, E. P. S.; COSTA, R. B.; SILVA, M. V. A.; LEITÃO, V. S. F.; FREITAS, S. P.; FERRARA, M. A. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. **IN: Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CHI, W.-J.; LIM, J. H.; PARK, D. Y.; PARK, J. S.; HONG, S.-K. Production and characterization of a thermostable endo-type β -xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1736-1743, 2013.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012.

GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GONG, X.; GRUNINIGER, R. J.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M.; McALLISTER, T. A. Biochemical analysis of a high specific, pH stable xylanase gene identified from a

bovine rumen-derived metagenomic library. **Appl Microbiol Biotechnol**, 97:2423-2431, 2013.

GUO, B.; LI, P.; YUE, Y.; ZHAO, H.; DONG, S.; SONG, X.; SUN, C.; ZHANG, W.; CHEN, X.; ZHANG, X.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Gene Cloning, Expression and Characterization of a Novel Xylanase from the Marine Bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Mar. Drugs**, v.11, p.1173-1187, 2013.

HUANG, X.; FAN J.; YANG, Q.; CHEN, X.; LIU, Z.; WANG, Y.; WANG, D. Cloning, expression, and characterization of endoglucanase gene egIV from *Trichoderma viride* AS 3.3711. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.3, p.390-399, 2012.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. produção e xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **B.CEPPA**, Curitiba, v.25, n.2, p.207-216, 2007.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, n.4, p.411-456, 1999.

LIMA, A. L.G; NASCIMENTO, R. P; BOM, P. S; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 272-277, 2005.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p.717-725, 2011.

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

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production, purification, and Characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 88, p.150-161, 2014.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBERG, E. L. J.; NCUBE, I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA 733 in solid-state fermentation. **Ind. Crops Prod.**, v. 37, p. 118-123, 2012.

- OLIVEIRA, G.S.; ULHOA, C. J.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FARIA, F. P. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p.19-26, 2013.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, n.2, p.81-84, 2003.
- PANWAR, D.; SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus sp.* PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, p. 118-125, 2014.
- RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Casa do Espírito Amigo Fraternidade fé e Amor, Campinas, 2^a ed, 2009.
- ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. **II Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais – II SIGERA**, Foz do Iguaçu, PR, 2011.
- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI. I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by using residue *Aspergillus niger* of mango a substrate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.12, p.2210-2216, 2011.
- SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, G. A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.1, p.65-71, 2013.
- SHARMA, P.; SINGH, L.; DILBAGHI, N. Optimization of process variables for decolorization of disperse yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box–Beknken design. **J. Hazard. Mater.**, v.169, p.1024–1029, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PILLAI A.; PREMA P.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Solid state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulose production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p.332-336, 2006.

SONG, J. M.; WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p.1930-1934, 2010.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova**, v.29, n.2, p.338-350, 2006.

VERMA, D.; KAWARABAYASI, Y.; MIYAZAKI, K.; SATYANARAYANA, T. Cloning, Expression and Characteristics of a Novel Alkalistable and Thermostable Xylanase Encoding Gene (Myxl) Retrieved from Compost-Soil Metagenome. **Plos One**, v.8, p.1-9, 2013.

VICENTINI, F. C.; FILHO, L. C. S. F.; JANEGITZ, B. C.; SANTIAGO, A.; FILHO, E. R. P.; FILHO, O. F. Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Quím. Nova**, v.34, n.5, p.825-830, 2011.

WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. In: YANG, S (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier, 2007, ch. 18, p. 465-489.

ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC – UPF**, v.6, n.2, p. 40-47, 2014.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering** 88, 797–824. 2004.

ZHAO, J.; SHI, P.; YANG, P.; LUO, H.; BAI, Y.; WANG, Y.; YAO, B. Two neutral thermostable cellulases from *Phialophora* sp. G5 act synergistically in the hydrolysis of filter paper. **Bioresour. Technol.** v. 121, p. 404-410, 2012.

ZHUANG, Y. P.; CHEN, B.; CHU, J.; ZHANG, C. Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p. 405-409, 2006.

CAPÍTULO III

Triagem, otimização da produção e caracterização de celulases e xilanase a partir da bioconversão da casca de amendoim por *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

Resumo: O presente trabalho avaliou a influência do tempo, temperatura e teor de umidade sobre a produção das enzimas celulolíticas, endoglucanase e xilanase, durante a fermentação em estado sólido da casca de amendoim, utilizando duas espécies fúngicas, o *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. A triagem inicial foi desenvolvida com o planejamento fatorial completo 2^3 utilizando como variáveis, a temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade. Com o auxílio do Delineamento Box Behnken foi otimizado a produção das enzimas pelo fungo *A. oryzae*. Para a enzima endoglucanase foram encontrados os seguintes valores 192 horas de fermentação, 36°C de temperatura, teor de umidade de 50 % com a atividade enzimática de 4,29 U/mL. Para a xilanase a otimização esteve nos seguintes valores encontrados 151 horas de fermentação, 36°C de temperatura com 50% de umidade, obtendo uma atividade enzimática de 9,54 U/mL. A celulase total foi otimizada nas condições de 133 horas de fermentação, 34°C de temperatura com 50% de umidade, obtendo uma atividade enzimática de 0,400 U/mL. Foi realizada a caracterização das enzimas endoglucanase e xilanase otimizadas utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 , as enzimas demonstraram grande tolerância à temperatura de 50°C a cerca de 150 minutos. Com relação ao pH tanto a endoglucanase como a xilanase foram mais estável a pH 7 a 9. A produção das enzimas endoglucanase e xilanase a partir da casca de amendoim demonstra grande premissa em processos industriais.

Palavras-Chave: fungos Filamentosos, fermentação em estado sólido, enzimas.

Screening, optimization and characterization of cellulase and xylanase from rice husk bioconversion by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*.

Abstract: This study evaluated the influence of time, temperature and moisture content on the production of cellulolytic enzymes, endoglucanase and xylanase, during solid-state fermentation of peanut shell, using two fungal species, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. The experiments were conducted in the Agribusiness Microbiology Laboratory at the State University of Southwest Bahia - UESC. The initial screening was conducted with the full factorial design 2^3 using as variables, temperature, fermentation time and moisture content. Using the Design Box Behnken was optimized the production of enzymes by *A. oryzae* fungus. The endoglucanase enzyme found the following values fermentation 192 h, temperature 36°C, 50% moisture content with the enzymatic activity of 4,29 U/mL. For xylanase optimization was the following values found 151 hours of fermentation, temperature 36°C with 50% humidity, obtaining an enzymatic activity of 9,54 U/mL. The whole cellulase was optimized under the conditions of 133 hours of fermentation, temperature 34°C 50% humidity, obtaining an enzyme activity of 0,400 U/mL. The

characterization of endoglucanase enzymes and xylanase optimized using full factorial design 2³ was performed, the enzymes showed great tolerance to temperature of 50°C to about 150 minutes. With respect to the pH both endoglucanase and xylanase was stable at pH 7 to 9. The production of xylanase and endoglucanase enzymes from peanut hulls shows great promise in industrial.

Keywords: filamentous fungi, solid state fermentation, enzymes.

3.1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores naturais e sua capacidade de realizar transformações químicas muito específicas tornou-os cada vez mais útil no processo industrial. São aplicadas em vários campos, incluindo a fabricação de alimentos, nutrição animal, cosméticos, medicamento e como ferramentas de pesquisa e desenvolvimento, dentre outros. Atualmente aproximadamente 4.000 enzimas são conhecidas, e destes, em torno de 200 tipos originados de micro-organismos são utilizados comercialmente, no entanto, apenas cerca de 20 enzimas são produzidas em escala verdadeiramente industrial (Li et al., 2012).

A maior parte das enzimas microbianas empregadas é produzida por um número limitado de micro-organismos, dentre esses, os fungos filamentosos que são utilizados principalmente nas indústrias alimentícias: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*, etc., por ser reconhecidamente seguro para utilização humana (GRAS). Comercialmente disponíveis as enzimas utilizadas são celulasas, xilanases, amilases, proteases, lipases, pectinases etc (GUSMÃO et al., 2014; MONCLARO, 2014).

As celulasas e Xilanases microbianas têm fascinado o pesquisador por causa de suas potenciais aplicações como clarificação de sucos de frutas e vinhos, na indústria de panificação para melhorar propriedades sensoriais da massa, conversão de resíduos de biomassa para açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis e outros produtos químicos (SAHA et al., 2014; KUAD et al., 2011).

A aplicação desses biocatalisadores em larga escala reflete em um alto custo para as operações industriais, isso ocorre devido ao custo elevado para a produção e obtenção das enzimas, para mudar esta realidade, pesquisas têm sido realizadas na procura por formas de baratear os custos, como por exemplo, na utilização de fontes alternativas para nutrir o crescimento dos micro-organismos, a partir da casca e farelo de mandioca, bagaço e palha

de cana, palha de sorgo, casca de arroz, casca de amendoim e outros compostos (STROPARO et al., 2012; SARKAR et al., 2012; MONTEIRO, SILVA 2009).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo, temperatura e teor de umidade sobre a produção das enzimas celulase total, endoglucanase e xilanase, durante a fermentação em estado sólido da casca de amendoim, utilizando duas espécies fúngicas, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

A casca de amendoim utilizada nos experimentos foi adquirida na feira livre de Itabuna na Região Sul da Bahia. As cascas foram trituradas em um moinho de facas tipo Willey TE-650 TECNAL[®] (Piracicaba/São Paulo- Brasil), a uma granulometria em torno de 2,0 mm de diâmetro e armazenadas em recipientes de polietileno para realização das análises. Os micro-organismos utilizados para a fermentação foram *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* ambos doados pela Fundação Fiocruz.

3.2.2 Condições Experimentais

3.2.2.1 Preparo do inóculo *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*

Os micro-organismos foram mantidos em ágar batata inclinado entre 2 a 4°C e repicados a cada dois meses. Antes de cada experimento os fungos filamentosos *A. niger* e *A. oryzae* foram cultivados em erlenmeyers contendo o meio sólido de PDA (Potato Dextrose Agar) durante 07 dias a 30°C em estufa bacteriológica (SOLAB modelo SL 101). O preparo do inóculo ocorreu através da adição de 20 ml de uma solução estéril de Tween 80 a 0,1% com auxílio de pérolas de vidro para raspagem dos esporos. A contagem do número de esporos presente nesta suspensão foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer duplamente espelhada com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi ajustada para 10^7 esporos/g de resíduo sólido (NCUBE et al., 2012).

3.2.2.2 Bioprocesso – Fermentação em estado sólido

Foram utilizados erlenmeyers de 250 ml como biorreatores para o processo fermentativo tendo como meio de cultivo a casca de amendoim. Foram pesados 10g do

substrato e submetidos à esterilização em autoclave a 121°C e 1,0 atm. de pressão por 15 minutos. Após resfriamento, foi inoculada sobre o substrato a suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/grama de resíduo. As fermentações foram conduzidas em estufas bacteriológicas B.O.D (Tabela 3.1 e 3.2). O cálculo do volume de água adicionado para se chegar às umidades desejadas foi realizado mediante o conteúdo de matéria seca do resíduo, através do determinador de umidade infravermelho MARTE ID200.

3.2.2.3 Extração da enzima

Para a obtenção dos extratos enzimáticos após o processo fermentativo da casca de amendoim, foi adicionado em cada biorreator 100 ml de solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8 a 50 mM). Os extratos foram homogeneizados em um agitador rotatório a 30°C e 200 rpm por 30 minutos. A extração foi realizada por prensagem mecânica (filtração por pressão) para a obtenção do extrato bruto enzimático, o qual foi centrifugado a $15.115 \times g$ por 15 minutos em centrífuga (Heraeus Megafuge 16R) para remoção de sólidos mais finos, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem das atividades enzimáticas (SANTOS et al., 2011(a)).

3.2.3 Determinação da atividade enzimática

3.2.3.1 Atividade de Carboximetilcelulase (endoglucanase)

A atividade da enzima CMCase (endoglucanase) foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na degradação da carboximetilcelulose (CMC) (SIGMA) a 2% (p/v) diluído previamente na solução tampão citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Os ensaios reacionais foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 250 µl de extrato enzimático e 250 µl de CMC. Para o controle da reação foram adicionados 250 µl da solução tampão citrato de sódio e 250 µl de extrato enzimático. No branco da análise foi adicionado 250 µl de CMC e 250 µl de solução tampão. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C durante 10 minutos e a interrupção da reação foi realizada com a adição de 0,5 ml de DNS. Os tubos foram submersos em água fervente por 5 minutos e posteriormente foram adicionados 5,0 ml de água destilada. A leitura da absorbância foi medida na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a

quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto nestas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

3.2.3.2 Celulases Totais (complexo endoglucanases e exoglucanases)

A atividade de celulases totais abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959) através dos açúcares redutores liberado pela degradação de uma tira de papel filtro Whatman n°1 (1,0 cm x 6,0 cm). Nos tubos reacionais foram adicionados 1,0 ml de solução tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM e 0,5 ml do extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Para o controle da reação foram adicionados 1,0 ml da mesma solução tampão e 0,5 ml de extrato enzimático, e no branco da análise foram adicionados 1,5 ml de solução tampão e uma tira de papel filtro. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3 ml de DNS e todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 ml de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto nestas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

3.2.3.3 Atividade da Xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo MILLER (1959) através da liberação de açúcares redutores pela hidrólise da xilana. Nos tubos reacionais foram adicionados 125 μl de extrato enzimático e 125 μl de solução xilana 1% (SIGMA) diluída em tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM. Para o controle da reação, foram adicionados 125 μl da solução tampão citrato de sódio e 125 μl de extrato enzimático, enquanto no branco para zerar o espectrofotômetro foram adicionados 125 μl da solução tampão citrato de sódio e 125 μl de solução xilana 1%. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 250 μl da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos foram submetidos à água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 20 ml de água destilada para posterior medição da absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a

quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto nestas condições de ensaio (GHOSE, 1987).

3.2.3.4 Cálculo para as atividades enzimáticas celulolíticas e xilanolíticas

A curva padrão para a endoglucanase e celulasas totais foi constituída a partir da determinação de glicose (SIGMA) e a curva padrão para a xilanase foi obtida pela determinação de xilose (SIGMA), ambas nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do DNS (MILLER, 1959) com posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

3.2.4 Condições de reação enzimática

Os ensaios foram realizados conforme planejamento fatorial completo 2^3 , apresentado no item 2.2.5.3. A influência da temperatura, tempo de reação e pH sobre a atividade das enzimas estudadas foi avaliada no intervalo de 40 a 80°C, 30 a 150 min e pH 3 a 9 com o objetivo de encontrar a melhor condição de reação das enzimas agindo simultaneamente. Após o tempo de reação os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e a determinação da atividade enzimática seguiu conforme descrito anteriormente.

3.2.5 Planejamento Experimental

3.2.5.1 Triagem

Foi elaborado um planejamento fatorial completo 2^3 , cuja matriz está representada na Tabela 3.1 para avaliar três variáveis: temperatura, teor de umidade e tempo de fermentação, relacionadas com a produtividade enzimática. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis (+1 e -1) contando ainda com quatro repetições no ponto central (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, totalizando 12 ensaios, a partir da verificação dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR).

Tabela 3.1 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada na triagem para produção enzimática e caracterização enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X ₁	25	30	35
Tempo (horas) – X ₂	24	72	120
Teor de umidade (%) – X ₃	50	60	70

3.2.5.2 Otimização da produção enzimática.

A otimização da produção das enzimas foi realizada pelo delineamento fatorial 3³ incompleto com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (BOX e BENHKEN, 1960), para determinar a condição ótima e o modelo empírico que correlaciona e eficiência das três variáveis. A partir da verificação dos resultados foram aplicados à metodologia da superfície de resposta (MSR). A Tabela 3.2 informa os níveis e os valores correspondentes aos reais e codificados.

Tabela 3.2- Variáveis codificadas e não codificadas do delineamento Box Benhken para a otimização das enzimas.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X ₁	30	35	40
Tempo (horas) – X ₂	96	144	192
Teor de umidade (%) – X ₃	50	60	70

Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1), dados experimentais e de regressão coeficiente foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtido por regressão linear múltipla, onde β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , e β_{ijk} representar todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de X_i, e o efeito de interação entre X_i e X_j; X_i, X_j e X_k sobre a atividade enzimática, respectivamente, e e é o erro do modelo.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ij} X_i X_j X_k + e \quad (1)$$

A partir da análise de variância (ANOVA) a qualidade do ajuste dos modelos gerados foi avaliada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) por meio da significância de regressão, falta de ajuste e o coeficiente de determinação múltipla. Os efeitos foram

considerados significativos quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o programa *Statistica versão 8.0* (STATSOFT 2007) e *Sigma Plot versão 11.0* para analisar os dados experimentais.

3.2.5.3 Avaliação das condições de reação enzimática

Para se determinar as condições de reação das enzimas otimizadas foi elaborado um planejamento fatorial completo 2^3 , cuja matriz está representada na Tabela 3.3 para avaliar três variáveis: temperatura, pH e tempo de incubação. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis (+1 e -1) contando ainda com quatro repetições no ponto central (nível zero), totalizando 12 ensaios. A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para avaliar a atividade residual das enzimas submetidas a condições extremas.

Tabela 3.3 - Variáveis codificadas e não codificadas do planejamento fatorial 2^3 utilizada nas condições de reação enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C) – X_1	40	60	80
pH – X_2	3	6	9
Tempo (min.)– X_3	30	90	150

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Determinação das condições de cultivo na casca de amendoim pelos fungos *A. niger* e *A. oryzae*.

Estudo da produção enzimática pelo A. niger

Foi realizada uma triagem através do planejamento fatorial completo do tipo 2^3 para analisar a influência das variáveis independentes sobre a produção das enzimas pelo *A. niger* com a casca de amendoim. As variáveis estudadas foram temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade, definindo os mais significativos. A Tabela 3.4 apresenta o planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase.

Tabela 3.4 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta		
	Temperatura	Tempo	Teor de Umidade	Atv. CMCASE	Atv. FPASE	Atv. XILANASE
	°C	h	%	U/ml	U/ml	U/ml
1	25 (-1)	24 (-1)	50 (-1)	0,883	0,000	2,006
2	35 (+1)	24 (-1)	50 (-1)	1,427	0,000	3,218
3	25 (-1)	24 (-1)	70 (+1)	0,876	0,000	1,671
4	35 (+1)	24 (-1)	70 (+1)	0,949	0,058	2,347
5	25 (-1)	120 (+1)	50 (-1)	2,019	0,287	3,941
6	35 (+1)	120 (+1)	50 (-1)	2,746	0,796	4,193
7	25 (-1)	120 (+1)	70 (+1)	2,008	0,243	3,543
8	35 (+1)	120 (+1)	70 (+1)	2,615	0,379	3,711
9	30 (0)	72 (0)	60 (0)	2,765	0,496	4,368
10	30 (0)	72 (0)	60 (0)	3,366	0,601	4,540
11	30 (0)	72 (0)	60 (0)	3,095	0,518	4,256
12	30 (0)	72 (0)	60 (0)	3,573	0,571	4,319

Os dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por *A. niger*.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus niger</i>					
Celulase total (FPASE)					
Modelo	1	0,3391	0,3390	6,99	0,02
Erro	10	0,4849	0,0485		
Falta de ajuste	7	0,4780	0,0683	29,55	0,009

Erro puro	3	0,0069	0,0023		
Total	11	0,8240			
R ²	0,4115				

Endoglucanase (CMCASE)

Regressão	6	4,0968	0,6828	0,53	0,7700
Erro	5	6,4575	1,2915		
Falta de ajuste	2	6,0906	3,0453	24,90	0,0135
Erro puro	3	0,3669	0,1223		
Total	11	10,5543			
R ²	0,3882				

Xilanase

Regressão	1	4,7217	4,7217	7,79	0,02
Erro	10	6,0639	0,8598		
Falta de ajuste	7	6,0191	2,2393	57,53	0,003
Erro puro	3	0,0448	0,0149		
Total	11	10,7856			
R ²	0,4378				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação F_{tab. FPASE (1,10) = 4,96}; F_{tab. CMCase (6, 5) = 4,95}; F_{tab. XILANASE (1,10) = 4,96}.

De acordo com os resultados da ANOVA foi observado que para as enzimas celulase total e xilanase foi obtido um valor de F calculado maior que o valor de F tabelado, dessa forma, os modelos pode ser considerado estatisticamente significativo. Para enzima endoglucanase o valor de F calculado foi menor que o valor de F tabelado, no qual o modelo não é considerado significativo e a falta de ajuste para todas as enzimas foi significativa indicando que o modelo utilizado não foi apropriado.

Através do gráfico de Pareto (Figura 3.1) podem ser visualizados os fatores que são estatisticamente significativos com 95% de confiança (p = 0, 05) representada pela linha vertical tracejada.

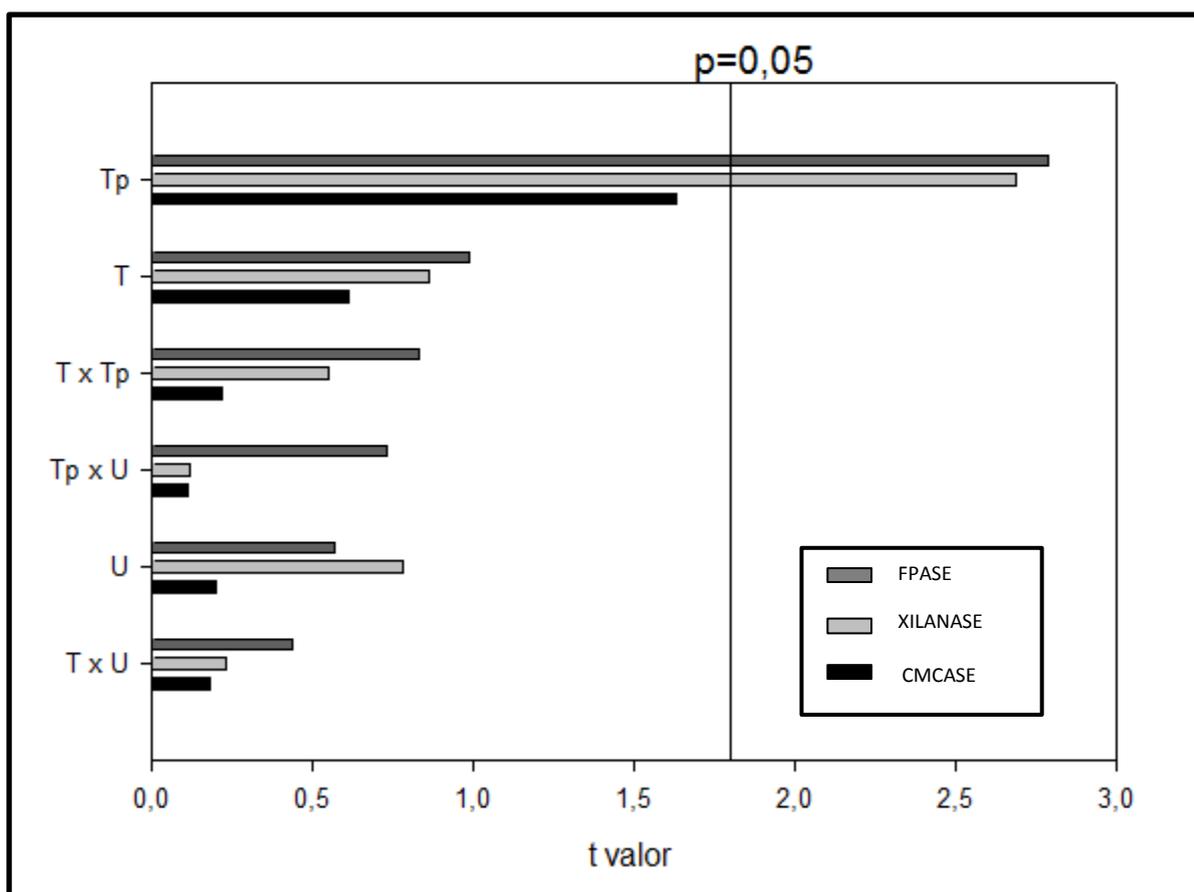


Figura 3.1 – Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus niger*.

De acordo com o gráfico de pareto (Figura 3.1) é possível observar que a variável tempo de fermentação foi significativo para a celulase total e xilanase. Já para a enzima endoglucanase nenhum dos fatores foi significativo. Pode ser observado também que as interações entre as variáveis, tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade não foram significativas para nenhuma das enzimas avaliadas.

Visto que o planejamento fatorial foi utilizado apenas para a triagem das variáveis, pode estabelecer a superfície de resposta para indicar a tendência a ser tomada na otimização. Na Figura 3.2 são apresentadas as superfícies de resposta das atividades enzimáticas da celulase total, xilanase e endoglucanase em função das variáveis significativas.

Observa-se na Figura 3.2 (a) e (b) que o tempo de fermentação influenciou positivamente para a atividade da celulase total e xilanase, ou seja, aumentando o tempo de fermentação, maiores valores da atividade enzimática são obtidas. Na Figura 3.2 (c) embora não houve significância para os parâmetros estudados, mostra uma tendência para obtenção de maiores valores da atividade enzimática da endoglucanase com o aumento da temperatura e tempo de fermentação.

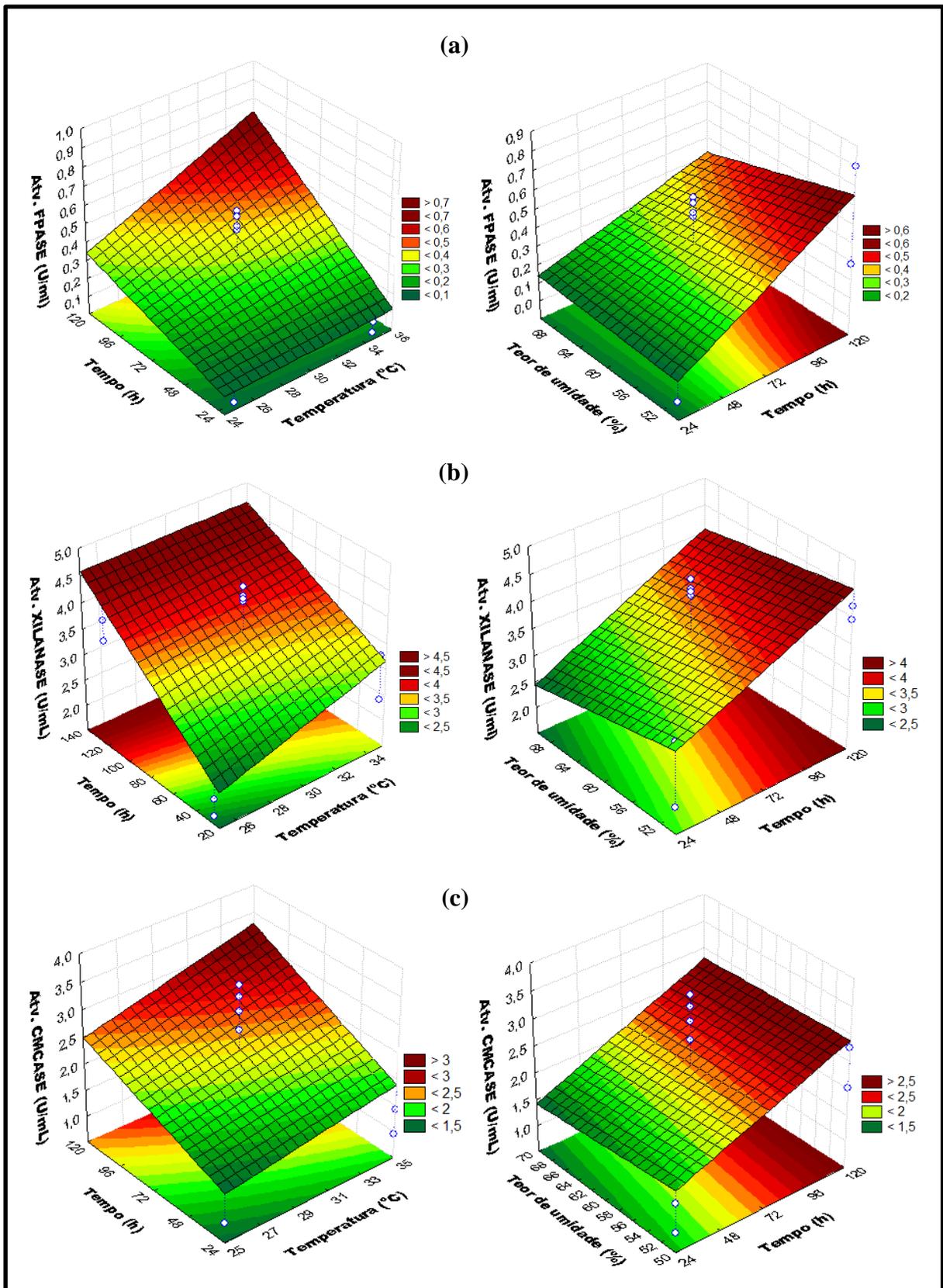


Figura 3.2 – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Celulase total (FPASE) b) Xilanase c) Endoglucanase (CMCASE).

Estudo da produção enzimática pelo A. oryzae

Visando analisar a influência das variáveis independentes sobre a produção das enzimas pelo *A. oryzae* com a casca de amendoim, foi realizada primeiramente uma triagem através do planejamento fatorial completo do tipo 2³. As variáveis estudadas foram temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade, definindo os mais significativos. A Tabela 3.6 apresenta o planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase.

Tabela 3.6 – Matriz do planejamento fatorial completo 2³ (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase pelo *A. oryzae*.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta		
	Temperatura	Tempo	Teor de Umidade	Atv. CMCASE	Atv. FPASE	Atv. XILANASE
	°C	h	%	U/ml	U/ml	U/ml
1	25 (-1)	24 (-1)	50 (-1)	0,536	0,130	1,383
2	35 (+1)	24 (-1)	50 (-1)	0,894	0,208	1,460
3	25 (-1)	24 (-1)	70 (+1)	0,582	0,103	1,354
4	35 (+1)	24 (-1)	70 (+1)	0,896	0,215	1,983
5	25 (-1)	120 (+1)	50 (-1)	0,558	0,435	2,108
6	35 (+1)	120 (+1)	50 (-1)	1,288	0,352	4,240
7	25 (-1)	120 (+1)	70 (+1)	0,551	0,352	2,165
8	35 (+1)	120 (+1)	70 (+1)	0,783	0,424	2,880
9	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,643	0,440	2,520
10	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,593	0,411	2,661
11	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,645	0,416	2,489
12	30 (0)	72 (0)	60 (0)	0,645	0,392	2,320

A partir dos dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial 2^3 produzidas por *A. oryzae*.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus oryzae</i>					
Celulase total (FPASE)					
Modelo	1	0,1028	0,1028	15,35	0,003
Erro	10	0,0670	0,0067		
Falta de ajuste	7	0,0658	0,0094	24,09	0,01
Erro puro	3	0,0012	0,0004		
Total	11	0,1698			
R ²	0,6056				
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	1	0,3096	0,3096	20,11	0,001
Erro	10	0,1540	0,0154		
Falta de ajuste	7	0,1520	0,0271	32,92	0,007
Erro puro	3	0,0020	0,0006		
Total	11	0,4636			
R ²	0,6679				
Xilanase					
Modelo	2	4,9749	2,4874	11,89	0,003
Erro	9	1,8823	0,2091		
Falta de ajuste	6	1,7557	0,2926	6,93	0,07
Erro puro	3	0,1266	0,0422		
Total	11	6,8572			
R ²	0,7255				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação F_{tab. FPASE (1,10)} = 4,96; F_{tab. CMCASE (1,10)} = 4,96; F_{tab. XILANASE (2,9)} = 4,26.

Conforme os resultados da ANOVA pode-se observar que para as enzimas celulase total e endoglucanase o F calculado foi maior que o F tabelado, portanto, o modelo é

estatisticamente significativo, no entanto, a falta de ajuste para ambas as enzimas foi significativo, indicando que o modelo não é apropriado.

Para a enzima xilanase o F calculado foi maior que o F tabelado, sendo, portanto, estatisticamente significativo e a falta de ajuste foi não significativo, indicando que o modelo foi apropriado. O gráfico de Pareto (Figura 3.3) mostra os fatores que são estatisticamente significativos com 95% de confiança ($p = 0,05$) representada pela linha vertical tracejada.

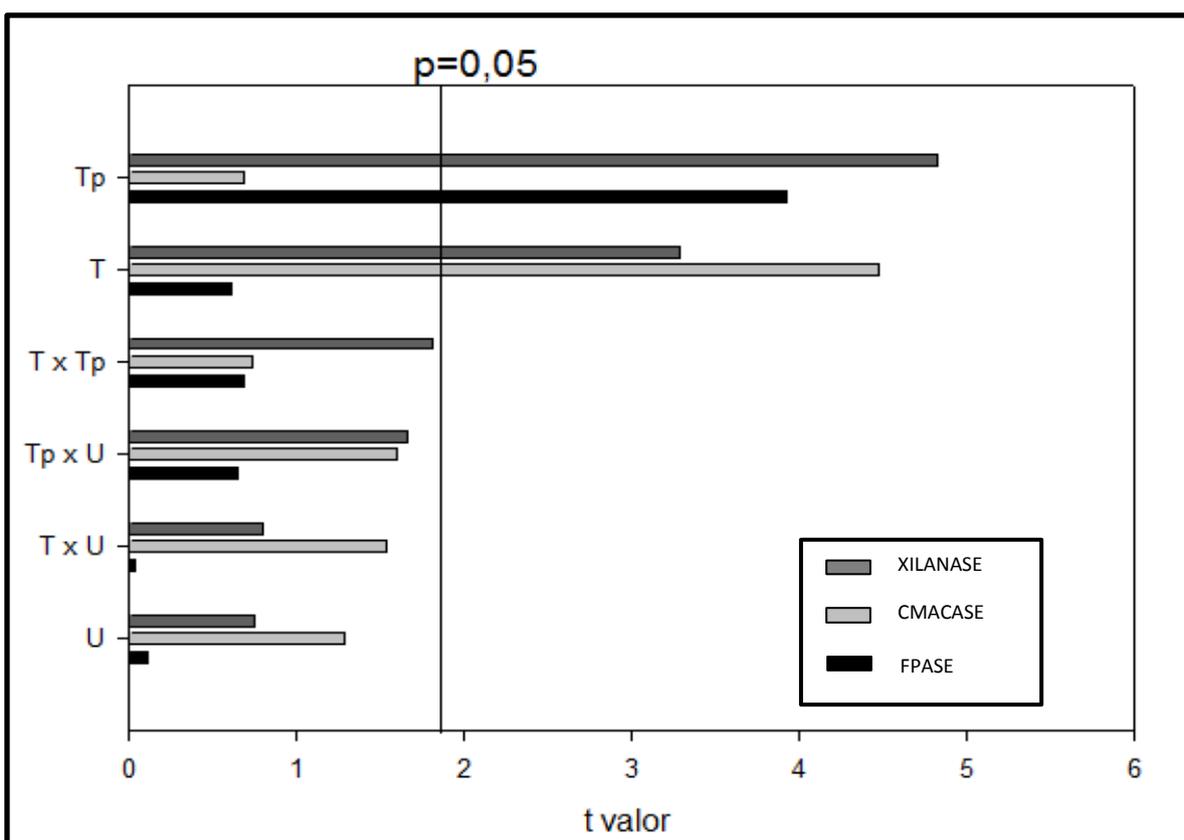


Figura 3.3 – Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.

No gráfico de Pareto (Figura 3.3) é possível observar que a variável tempo de fermentação foi significativo para a xilanase e celulase total e a variável temperatura foi significativa para a xilanase e endoglucanase. Pode ser observado também que as interações entre as variáveis, tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade não foram significativas para nenhuma das enzimas avaliadas.

O planejamento fatorial foi utilizado apenas para a triagem das variáveis, não sendo necessária a obtenção de modelos matemáticos, podendo assim estabelecer a superfície de resposta para indicar a tendência a ser tomada na otimização. Na Figura 3.4 são

apresentadas as superfícies de resposta das atividades enzimáticas da celulase total, xilanase e endoglucanase em função das variáveis significativas.

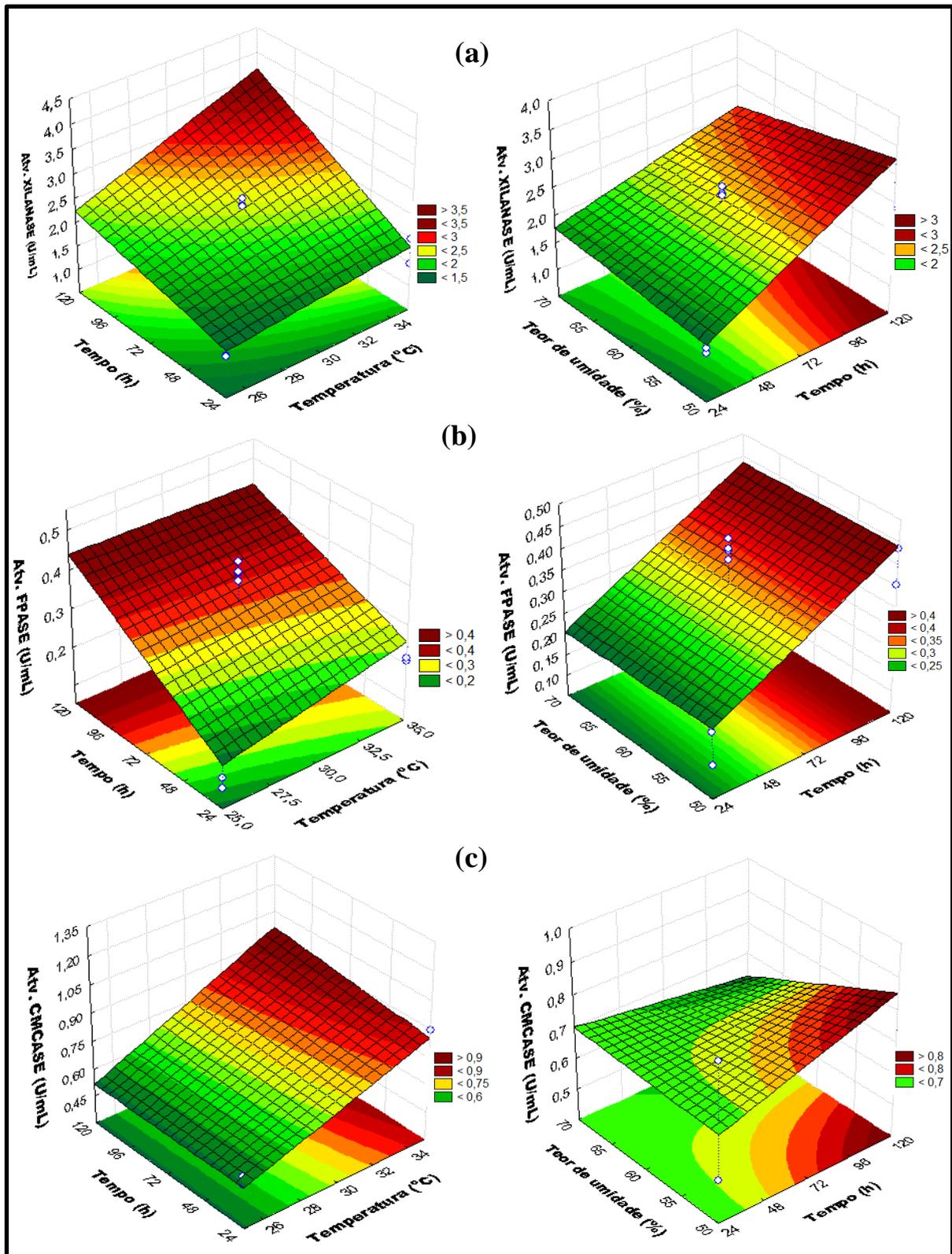


Figura 3.4 – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação, temperatura e teor de umidade: a) Celulase total (FPASE) b) Xilanase c) Endoglucanase (CMCASE).

Na Figura 3.4 (a) e (b) observa-se que uma maior atividade da enzima xilanase e celulase total, respectivamente, são alcançadas com o aumento do tempo de fermentação e aplicação de temperaturas mais elevadas, ambas variáveis influenciaram positivamente para a atividade dessas enzimas. Na análise da Figura 3.4 (c), mostra que para a enzima endoglucanase há uma tendência para valores mais elevados da atividade enzimática aumentando o tempo de fermentação e temperatura.

Conforme os resultados obtidos na triagem, o fungo filamentososo *A. niger* apesar de ter obtido valores de atividade enzimática próximos ao *A. oryzae*, apresentou dificuldades para crescimento na casca de arroz, sendo necessária a realização de mais repetições, inviabilizando dessa forma a continuidade de sua utilização na etapa de otimização. E comparando-se a proporção da variação explicada entre os dois fungos, isto é, pela análise do coeficiente de determinação ajustada (R^2), baseado na análise de variância (ANOVA), o fungo *A. oryzae* foi o selecionado visto que as enzimas produzidas, endoglucanase e xilanase, obteve melhor resposta em relação ao *A. niger*.

3.3.2 Otimização das condições de cultivo das enzimas celulase total, endoglucanase e xilanase produzidas pelo fungo *A. oryzae*.

Para o estudo de otimização da produção das enzimas celulase total, endoglucanase e xilanase, realizou-se um Delineamento Box Behnken com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental visando maximizar a produção enzimática. Dessa forma, foi realizado um deslocamento dos valores para as variáveis: tempo de fermentação e temperatura, visto que ambas apresentaram uma tendência para valores mais elevados. Para o teor de umidade foi mantido os mesmos valores. O objetivo do deslocamento consiste em alterar os níveis das variáveis em estudo de modo a aumentar a resposta de interesse até atingir um ponto ótimo (ZHUANG et al., 2006). A Tabela 3.8 apresenta a matriz do delineamento Box Behnken (DBB) com os valores reais, codificados e as respostas para as enzimas.

Tabela 3.8 – Matriz do DBB (valores reais e codificados) com as repostas enzimáticas da endoglucanase (CMCASE), celulase total (FPASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta		
	Temperatura °C	Tempo h	Teor de Umidade %	Atv. CMCASE U/mL	Atv. XILANASE U/mL	Atv. FPASE U/mL

1	30 (-1)	96 (-1)	60 (0)	2,020	4,292	0,329
2	40 (+1)	96 (-1)	60 (0)	2,078	2,502	0,294
3	30 (-1)	192 (+1)	60 (0)	1,800	4,346	0,248
4	40 (+1)	192 (+1)	60 (0)	1,315	2,222	0,166
5	30 (-1)	144 (0)	50 (-1)	1,481	5,668	0,387
6	40 (+1)	144 (0)	50 (-1)	2,898	8,272	0,426
7	30 (-1)	144 (0)	70 (+1)	1,373	4,519	0,340
8	40 (+1)	144 (0)	70 (+1)	1,713	3,464	0,339
9	35 (0)	96 (-1)	50 (-1)	2,094	3,838	0,365
10	35 (0)	192 (+1)	50 (-1)	4,315	8,311	0,257
11	35 (0)	96 (-1)	70 (+1)	1,841	4,039	0,353
12	35 (0)	192 (+1)	70 (+1)	2,156	4,827	0,246
13	35 (0)	144 (0)	60 (0)	3,055	7,538	0,398
14	35 (0)	144 (0)	60 (0)	3,134	7,432	0,380
15	35 (0)	144 (0)	60 (0)	3,453	8,712	0,441

A partir dos dados obtidos das atividades enzimáticas nas condições estudadas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - ANOVA para as atividades enzimáticas da celulase total, endoglucanase e xilanase do DBB produzidas por *A. oryzae*.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus oryzae</i>					
Celulase total (FPASE)					
Modelo	2	0,0745	0,0373	57,4	<.0,001
Erro	10	0,0065	0,0007		
Falta de ajuste	8	0,0045	0,0006	1,54	0,417
Erro puro	2	0,0020	0,0010		
Total	14	0,0810			
R ²	0,9198				
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	3	8,1167	2,7056	12,47	0,04

Erro	11	2,3874	0,2170		
Falta de ajuste	9	2,2987	0,2554	17,27	0,055
Erro puro	2	0,0887	0,0444		
Total	14	10,5041			
R ²	0,7727				
Xilanase					
Modelo	3	56,9783	18,9928	22,23	0,001
Erro	11	9,3984	0,8544		
Falta de ajuste	9	8,3888	0,9321	5,54	0,156
Erro puro	2	1,0096	0,5048		
Total	14	66,3767			
R ²	0,8584				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. CMCASE (3,11)} = 3,59; F_{tab. XILANASE (3,11)} = 3,59; F_{tab. FPASE (2,10)} = 4,10.

Através da ANOVA constatou-se que a variação devido aos parâmetros da regressão de ambos os modelos polinomiais para as enzimas, celulase total, endoglucanase e xilanase foram estatisticamente significativas no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), ou seja, F calculado foi maior que o F tabelado, mostrando um valor ajustado de coeficiente de determinação de 0,9198, 0,7727 e 0,8584, ou seja, com 91,98, 77,27 e 85,84% da variação explicada para celulase total, endoglucanase e xilanase, respectivamente, existindo uma boa concordância entre os valores experimentais e os valores previstos do modelo.

A falta de ajuste não foi significativa e sugere que a equação do modelo foi adequada para prever a atividade das enzimas sob quaisquer conjuntos de combinação das variáveis. O resultado da ANOVA pode ser visualizado no diagrama de pareto (Figura 3.5) que demonstra a significância das variáveis estudadas na constituição do modelo matemático, onde cada elemento é traçado em ordem decrescente.

A partir dos dados apresentados no gráfico de pareto (Figura 3.5), pode-se visualizar que as variáveis temperatura e o teor de umidade foi significativa para a endoglucanase e xilanase. O tempo de fermentação foi significativo para as enzimas celulase total e xilanase. Abaixo estão descritos os modelos reduzidos obtidos para prever as atividades enzimáticas em função das variáveis e estão representados pelas equações (2), (3) e (4), em termos de valores não codificados.

$$AE_{FPASE} = 0,4062 - 0,1056Tp - 0,2148T^2 \quad (2)$$

$$AE_{CMCASE} = 3,214 + 0,332T - 2,146T^2 - 0,926U - 0,954Tp \times U \quad (3)$$

$$AE_{XILANASE} = 7,894 - 0,5908T - 4,326T^2 + 1,259Tp - 4,781Tp^2 - 2,31U \quad (4)$$

Onde, AE é a atividade enzimática, T é temperatura, Tp é o tempo de fermentação e U é o teor de umidade.

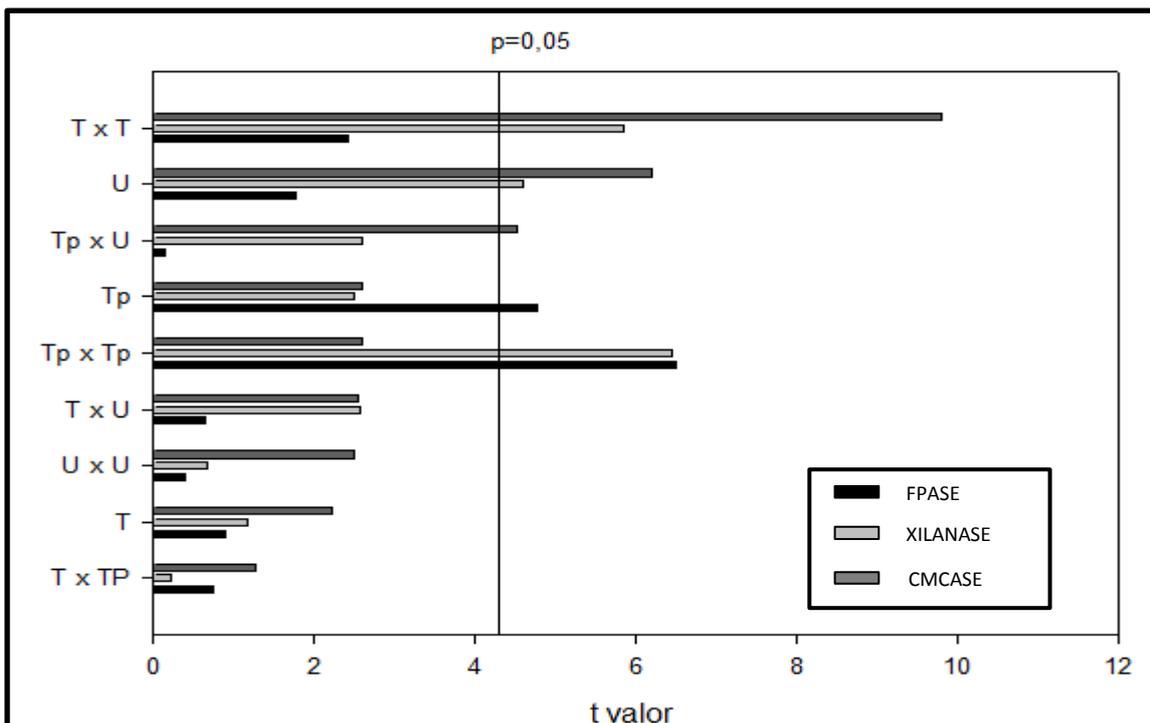


Figura 3.5 – Gráfico de Pareto para a atividade enzimática da endoglucanase (CMCASE), e xilanase mostrando a significância das variáveis, tempo de fermentação (Tp), temperatura (T) e teor de umidade (U) produzida por *Aspergillus oryzae*.

A superfície de resposta foi gerada a partir dos modelos matemáticos (Eq. (2, 3 e 4)) com base nas variáveis independentes, temperatura, tempo de fermentação e teor de umidade e está representada na Figura 3.6. As condições ótimas para a produção da endoglucanase (Figura 3.6 (a)) são no tempo de 192 horas, na temperatura de 36°C e com um teor de umidade de 50%. Nestas condições, a atividade máxima da endoglucanase prevista pelo modelo foi de 4, 18 U/mL próximo ao valor real obtido de 4,29 U/mL.

Para a produção da celulase total (Figura 3.6 (b)) as condições maximizadas são no tempo de fermentação de 133 horas, na temperatura de 34°C com um teor de umidade de 50%. Como a umidade não foi significativa vale ressaltar que o *Aspergillus oryzae* produziu a enzima utilizando a casca de amendoim em toda a faixa de umidade estudada de 50, 60 e 70%.

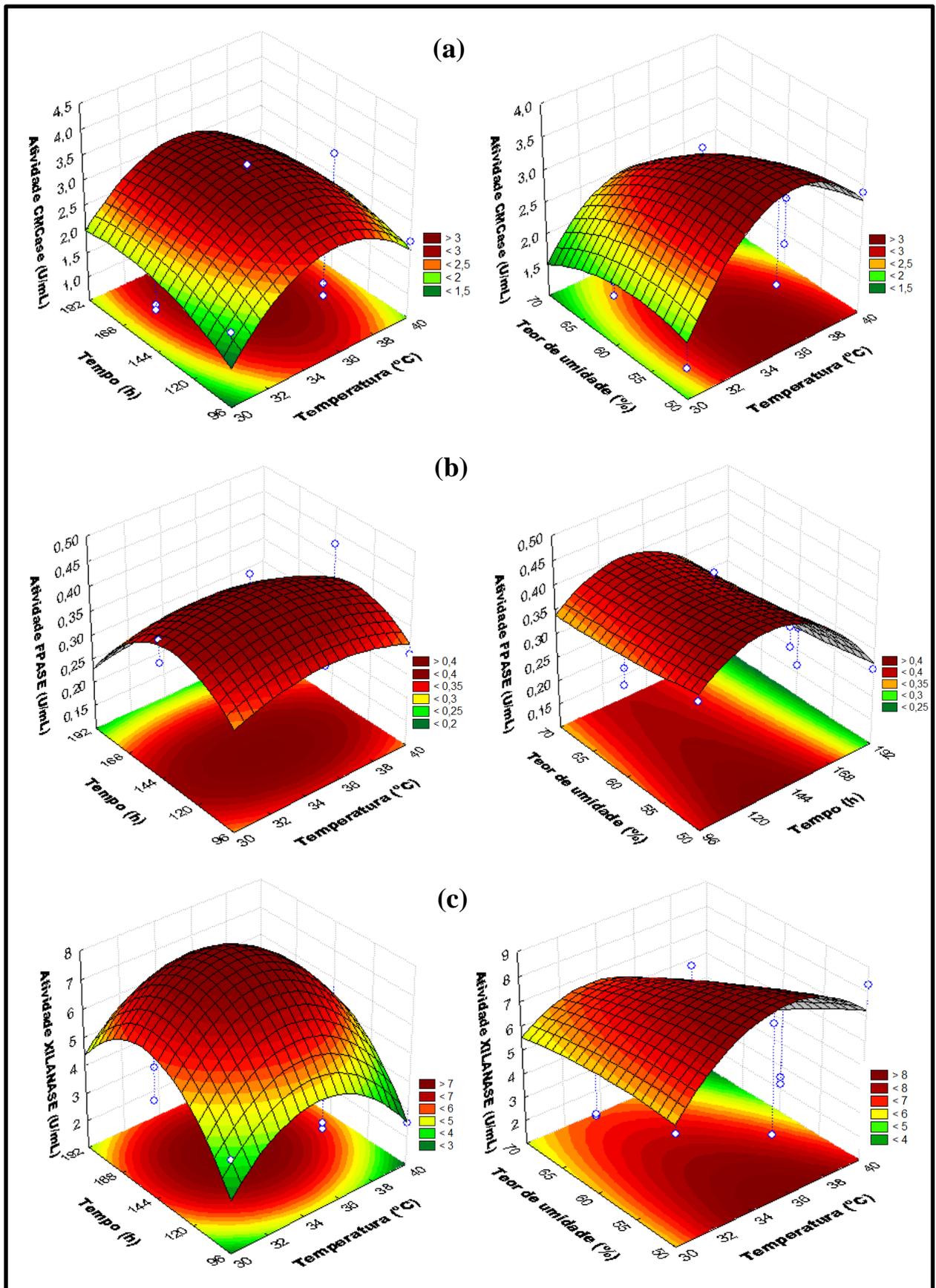


Figura 3.6 – Superfície de resposta dos modelos ajustados: (a) endoglucanase (CMCase); (b) celulase total; (c) Xilanase.

Dessa forma, a atividade máxima prevista pelo modelo para a celulase total foi de 0,400 U/mL, valor próximo ao real obtido de 0,406 U/mL.

As condições ótimas para a produção da xilanase (Figura 3.6 (c)) são no tempo de 151,3 horas, na temperatura de 36°C e com um teor de umidade de 50%. Nestas condições, a atividade máxima da xilanase prevista pelo modelo foi de 13,3 U/mL e o valor real obtido foi de 9,54 U/mL.

A umidade é um dos fatores que influenciam a produção enzimática na fermentação em estado sólido, esta varia de acordo com o tipo de micro-organismo, as condições empregadas no cultivo e o substrato utilizado. Esta variável afeta tanto o desenvolvimento microbiano quanto a produção das enzimas. O teor de umidade para o cultivo deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e transferência de nutrientes, portanto, umidade muito baixa resulta em menor absorção de água pelo substrato reduzindo a área superficial e a difusão dos nutrientes prejudicando o crescimento microbiano, por outro lado, um elevado nível de umidade reduz a porosidade do substrato, pode causar agregação das partículas, com isso reduz a disponibilidade de oxigênio, afetando o crescimento do micro-organismo e conseqüentemente a produção das enzimas (SANCHEZ, 2009; DOGARIS et al, 2009; DELABONA et al., 2013).

Para a otimização da produção da endoglucanase e xilanase a partir do cultivo sólido da casca de amendoim com o *A. oryzae* foi encontrado melhores valores em torno de 50% de umidade que corresponde a 0,899 de atividade de água (aw), conforme relata a literatura a atividade de água para fungos é em torno de 0,7- 0,8 podendo se desenvolver em valores mais elevados (FRANCO, LANDGRAF 2008).

A temperatura é outro fator que afeta o crescimento microbiano, a formação de esporos e conseqüentemente com a produção das enzimas (WANG, YANG 2007). De acordo com a Figura 3.6 (a) e (c) a influência significativa para a temperatura foi em torno de 34 a 37°C para a produção da atividade enzimática da xilanase e endoglucanase, em conseqüência dos fungos filamentosos possuem atividades metabólicas mesófilas o qual possuem temperatura ótima entre 25 e 40°C (FRANCO, LANDGRAF 2008). Com o aumento da temperatura, as reações químicas e enzimáticas da célula são mais rápidas e o crescimento se acelera, porém temperatura acima da ótima ocorre a inativação impedindo o seu crescimento e a produção enzimática (MADIGAN et al., 2004), fato observado no presente estudo, no qual a partir de 37°C houve redução na produção enzimática.

O tempo de fermentação para a produção enzimática da celulase total foi em um intervalo de 120 a 150 horas, ou seja, entre 5 a 7 dias. O que pode ter contribuído para esta

ocorrência é a presença de nutrientes na biomassa utilizada durante a fermentação contribuindo para o crescimento microbiano e a síntese enzimática, à medida que os microorganismos vão consumindo os nutrientes e ocorrendo o esgotamento destes, há conseqüentemente a diminuição da produção microbiana e por fim o declínio da produção enzimática que pode ser visualizada a partir de 150 horas de fermentação. Santos et al (2013) e Biazus et al (2006) também observaram que a produção de enzimas a princípio é lenta, acelerando até alcançar o seu valor máximo em um dado momento e por fim a redução da atividade.

Durante o processo fermentativo o fungo sintetizou a enzima tendo como indutores somente a casca de amendoim e água.

3.3.3 Estudo das condições de reação das enzimas endoglucanase e xilanase produzidas por *A. oryzae*.

Para o estudo das condições de reação das enzimas foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^3 para as variáveis temperatura, tempo de reação e pH, avaliando a resposta da atividade residual. A Tabela 3.10 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os valores reais, codificados e as respostas residuais da atividade enzimática da endoglucanase e xilanase.

Tabela 3.10 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores reais e codificados) com as repostas % da atividade enzimática residual da endoglucanase (CMCASE) e xilanase.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável Resposta	
	Temperatura °C	Tempo h	pH	Atv. CMCASE % residual	Atv. XILANASE % residual
1	40 (-1)	30 (-1)	3 (-1)	45,898	31,105
2	80 (+1)	30 (-1)	3 (-1)	37,870	29,460
3	40 (-1)	30 (-1)	9 (+1)	107,912	107,094
4	80 (+1)	30 (-1)	9 (+1)	35,776	30,651
5	40 (-1)	150 (+1)	3 (-1)	37,870	25,090
6	80 (+1)	150 (+1)	3 (-1)	45,084	29,800
7	40 (-1)	150 (+1)	9 (+1)	103,490	88,820
8	80 (+1)	150 (+1)	9 (+1)	39,150	25,543

9	60 (0)	90 (0)	6 (0)	88,598	28,778
10	60 (0)	90 (0)	6 (0)	87,318	29,743
11	60 (0)	90 (0)	6 (0)	88,039	28,268
12	60 (0)	90 (0)	6 (0)	88,714	28,438

A partir dos dados obtidos das condições de reações enzimáticas nos valores estudados, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão considerando apenas os termos significativos ($p < 0,05$), conforme apresentado na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - ANOVA para a caracterização enzimática da endoglucanase e xilanase do planejamento fatorial completo 2^3 .

	GL	SQ	QM	F	P
Endoglucanase (CMCASE)					
Modelo	4	6511,61	1627,90	4,35	0,03
Erro	7	2619,34	374,19		
Total	11	9130,95			
R ²	0,7731				
Xilanase					
Modelo	6	7409,38	1234,90	7,91	0,03
Erro	5	790,38	158,08		
Total	11	8199,76			
R ²	0,9036				

GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; p = Probabilidade; R² = Coeficiente de Determinação; F_{tab. XILANASE (6,5)} = 4,95; F_{tab. CMCase (4,7)} = 4,12.

A partir da ANOVA foi observado que para as enzimas endoglucanase e xilanase foi obtido um valor de F calculado maior que o valor de F tabelado, dessa forma, os modelos pode ser considerado estatisticamente significativo.

Os efeitos de temperatura, tempo de incubação e pH da atividade enzimática são fundamentais para se entender o comportamento enzimático e possivelmente determinar suas melhores condições de trabalho em diversos segmentos industriais. Os dados da tabela anterior foram utilizados para a construção do gráfico de Pareto na Figura 3.7.

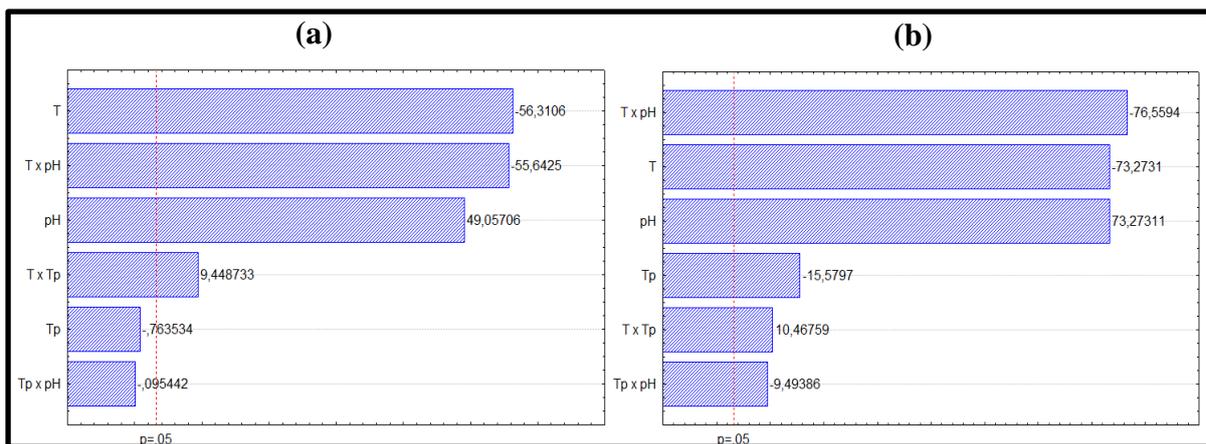


Figura 3.7 - Gráfico de Pareto da caracterização enzimática: a) endoglucanase; b) xilanase.

A temperatura apresentou um efeito significativo negativo em ambas às enzimas (Figura 3.7), entretanto o efeito é superior para a enzima xilanase, indicando que menores temperaturas são mais favoráveis. O pH apresentou efeito significativo positivo para a endoglucanase e xilanase, assim pode-se deduzir que melhores valores de atividade residual das enzimas pode ser mantida quando aplicados simultaneamente temperaturas mais baixas com pH mais elevado. O tempo de reação teve efeito negativo sobre a enzima xilanase, portanto, menores tempos favorece uma maior atividade residual da enzima. Apesar de não ter efeito estatisticamente significativo para a endoglucanase, a interferência do tempo de reação é negativo. A interação entre as variáveis foram significativos para a atividade residual da xilanase, embora a interação entre o tempo de incubação e pH não ter sido estatisticamente significativo para a endoglucanase, há uma interferência negativa.

Na figura 3.8 são apresentadas as superfícies de resposta da atividade residual das enzimas endoglucanase e xilanase em função das variáveis para uma melhor visualização dos efeitos em concordância com os gráficos de pareto acima.

Para a enzima endoglucanase pode-se observar na Figura 3.8 (a) que na interação entre a temperatura e o tempo de incubação para aplicação industrial até 50°C a enzima mantém uma atividade residual em torno de 90% por um tempo de incubação de 150 minutos, à medida que se aumenta a temperatura, ocorre uma redução na atividade enzimática. Na Figura 3.8 (b), a interação do pH e temperatura mostra que ao trabalhar com temperaturas mais amenas em torno de 40°C e com pH alcalino na faixa de 7 a 9 a enzima manteve uma atividade residual superior a 100%. E por fim a Figura 3.8 (c) indica que na interação do pH com a temperatura houve uma atividade residual da enzima por um período de 150 minutos de incubação com o pH acima de 7,0 em aproximadamente 80%, diminuindo o pH ocorre a redução da atividade enzimática.

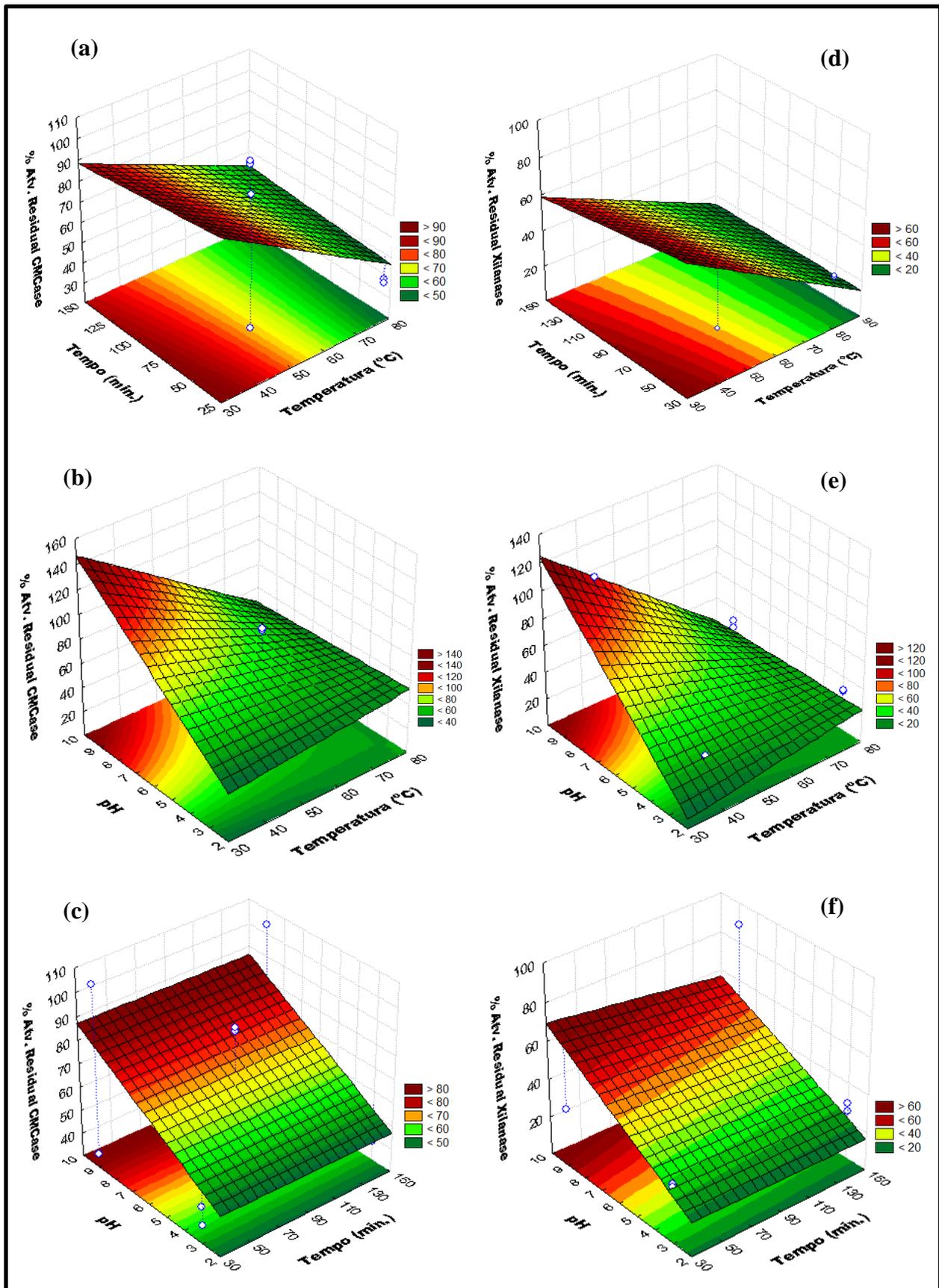


Figura 3.8 - Estabilidade enzimática ao pH, temperatura e tempo de incubação: a, b, c) endoglucanase – CMCase; d, e, f) xilanase produzidas por *A. oryzae*.

Portanto a aplicabilidade das três variáveis em conjunto para manter uma atividade residual da endoglucanase em torno dos 90%, deve-se utilizar a temperatura até 50°C com pH alcalino a partir de 7,0 para que se mantenha estável em 150 minutos de incubação.

Oliveira et al. (2013) verificaram que endoglucanase produzida por *Humicola grisea* manteve 88% da sua atividade residual após 240 minutos de incubação a 50, 60 e 70°C, tempo superior ao encontrado no presente trabalho que foi de 150 minutos. As temperaturas de 50 e 60° C aumentaram a atividade enzimática.

As endoglucanases presentes em extratos de linhagens de *Trichoderma spp* mostraram alta atividade residual na faixa de pH 3,5-5,5, mantendo acima de 80% de sua máxima atividade. Maior atividade de endoglucanase nesses extratos foi detectada em pH 4,5 (MAYRINK, 2010). Nos estudos realizados por Narra et al (2014) a endoglucanase de *A. terreus* se manteve ativa ao longo de um intervalo de pH de 3,6 a 5,0 e a enzima manteve 99% da sua atividade máxima após 150 minutos de incubação a 50°C, diferente deste trabalho que encontrou melhor atividade residual com pH alcalino.

Para a enzima xilanase na figura 3.8 (d) observa-se que na interação entre a temperatura e o tempo de incubação para aplicação industrial, até 50°C a enzima mantém uma atividade residual em torno de 60% por até 150 minutos de incubação, à medida que temperaturas mais elevadas são aplicadas, reduz drasticamente a atividade residual da enzima. Na figura 3.8 (e) a interação do pH e temperatura mostra que ao trabalhar com temperaturas mais amenas em torno de 40°C e com pH alcalino na faixa de 7 a 9 a enzima manteve uma atividade residual em torno de 100%, se aumentar a temperatura e/ou diminuir o valor do pH ocorre uma redução da atividade enzimática. Na interação do pH com o tempo de incubação demonstrado na Figura 3.8 (f), ao se trabalhar com pH acima de 7,0 a enzima mantém uma atividade residual em torno de 60% por um tempo de 150 minutos, no entanto, ao se utilizar valores de pH abaixo da neutralidade, há perdas da atividade enzimática. Dessa maneira, pode-se concluir que a melhor resposta é obtida há temperaturas inferiores de 50°C com pH na faixa de 7 a 9 ficando estável por até 150 minutos.

Shah e Madamwar (2005) descobriu que a xilanase produzida por um recém-isolado de *Aspergillus foetidus* foi altamente estável a 40°C, mas manteve apenas 36% de sua atividade residual em 50°C após 3 h de incubação. Na determinação da atividade residual da xilanase de *Penicillium occitanis*, Driss et al. (2011) verificaram alta atividade residual em temperaturas entre 45°C e 60°C, sendo mantida mais de 50% da atividade inicial depois de 1 hora de incubação.

Tanaka et al. (2005), que relataram que a xilanase de *Penicillium citrinum* manteve mais de 80% da atividade residual na faixa de pH de 2,0 a 10,0 quando incubada por 3 h a temperatura ambiente.

Vários estudos com foco nas condições de reação das enzimas endoglucanase e xilanase para os parâmetros de temperatura, pH e tempo de reação é de grande importância para o conhecimento da ação dessas enzimas sob diferentes condições. No entanto, a maior parte destes estudos os parâmetros são avaliados separadamente, que além de ser demorada, essa metodologia não informa os efeitos da interação entre essas variáveis, que é de grande interesse na aplicação industrial. Dessa forma, a utilização de um delineamento experimental seguido por metodologia de superfície de resposta permite identificar as melhores condições da atividade residual das enzimas em ação conjunta dos fatores pH, temperatura e tempo, fornecendo informações de grande valia para os mais diversos processamentos industriais.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o *Aspergillus oryzae* é bastante promissor para à obtenção de enzimas do complexo celulolítico com a fermentação em estado solido da casca de amendoim, permitindo o aproveitamento dessa biomassa residual e tornando possível a diversificação das fontes de matérias-primas para a produção de enzimas. Já fungo *A. niger* não apresentou boas condições de crescimento na casca de amendoim.

Em termos de atividade residual, as enzimas endoglucanase e xilanase demonstraram grande tolerância a exposição em ampla faixa de temperatura até 50°C e pH de 7 a 9 por cerca de 150 minutos de incubação, mantendo uma atividade residual superior a 60%.

Estes resultados indicam quais as condições ideais à indústria pode utilizar esse extrato multienzimático, como por exemplo, no processo de branqueamento de papéis, é aplicada a xilanase que atua em valores de pH entre 6,5 e 9,5 em temperaturas de 40°C a 65°C (COELHO et al.; 2008).

Devido aos baixos valores obtidos da atividade enzimática da celulase total (FPASE) após a otimização, não foi realizada o estudo das condições de reação para determinar a atividade residual dessa enzima.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca de amendoim com *Aspergillus oryzae* foi melhor produtor das enzimas celulolíticas comparado com a casca de arroz com o mesmo fungo filamentososo.

Na otimização, obteve-se uma maior atividade enzimática da endoglucanase tendo a casca de amendoim como substrato e não houve produção da enzima celulase total (FPASE) na otimização com a casca de arroz como substrato. Porém, essa enzima foi produzida com a casca de amendoim.

Não houve um bom crescimento do *Aspergillus niger* para ambos os resíduos, seguindo após a triagem a fermentação com o *A. oryzae*.

3.6 AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

3.7 REFERÊNCIA

BLAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.787-792, 2006.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDIC, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading production characterization. **Ind. Crops. Prod.**, v.42, p.236-242, 2013.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Ind. Crops. Prod.**, v.48, p.401-408, 2009.

DRISS, D., BHIRI, F., ELLEUCH, L., BOULY, N., STALS, I., MILED, N.; BLIBECH, M., GHORBEL, R., CHAABOUNI, S. E. Purification and properties of an extracellular acidophilic endo-1,4- β -xylanase, naturally deleted in the “thumb”, from *Penicillium occitnais* Pol6. **Process Biochemistry**, v 46, p.1299-1306, 2011.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo Editora Atheneu, 2008
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. V, LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v.10, 2014.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, London, v. 2011, p. 1-10, 2011.
- LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo – SP: Prentice Hall, 624 p, 2004.
- MAYRINK, M. I. C. B. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose**. 2010. 94 p. (Tese doutorado) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais – Brasil.
- MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanase produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescidos em resíduos têxteis**. (Dissertação Mestrado) Biologia Molecular – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v.III, p.9-23, 2009.
- NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production, purification, and Characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 88, p.150-161, 2014.
- NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA 733 in solid-state fermentation. **Ind. Crops Prod.**, v.37, p.118-123, 2012.

- OLIVEIRA, G.S.; ULHOA, C. J.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; POÇAS-FONSECA, M. J.; FARIA, F. P. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.19-26, 2013.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, n.21, 85-94, 2009.
- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by using residue *Aspergillus niger* of mango a substrate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.12, p.2210-2216, 2011.
- SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, G. A.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.1, p.65-71, jan./mar. 2013.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.
- SHAH, A. R., MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochem.** 40, 1763–1771. 2005.
- STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p.2267- 2278, 2012.
- TANAKA, H.; NAKAMURA, T.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular endo-1.4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v.100, p.623- 630, 2005.
- WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. In: YANG, S (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier, 2007, ch. 18, p. 465-489.
- ZHUANG, Y. P.; CHEN, B.; CHU, J.; ZHANG, C. Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p.405-409, 2006.