



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos



PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA
DE ENDOGLUCANASE DE *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA CASCA DA
AMÊNDOA DO CACAU

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2018

POLYANY CABRAL OLIVEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA
DE ENDOGLUCANASE DE *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 A
PARTIR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA CASCA DA
AMÊNDOA DO CACAU**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Nivio Batista Santana

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Fevereiro de 2018

633.74
O49p

Oliveira, Polyany Cabral

Produção e caracterização física e química de endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 a partir de fermentação em estado sólido da casca da amêndoa do cacau. / Polyany Cabral Oliveira. - Itapetinga: UESB, 2018. 67p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e coorientação do Prof. D.Sc. Nivio Batista Santana.

1. Hidrólise enzimática - Celulase. 2. Casca da amêndoa do cacau - Enzimas. 3. Resíduos agro-industriais. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Franco, Marcelo. III. Santana, Nivio Batista. IV. Título.

CDD(21): **633.74**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Hidrólise enzimática - Celulase
2. Casca da amêndoa do cacau - Enzimas
3. Resíduos agro-industriais



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE ENDOGLUCANASE DE *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 A PARTIR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA CASCA DA AMÊNDOA DO CACAU.

Autor (a): POLYANY CABRAL OLIVEIRA

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientador (a): Prof.º Dr. Nívio Batista Santana

Aprovada 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.

Prof. Dr. Nívio Batista Santana (Coorientador, UESB)

Prof.ª Dr.ª Andréa Gomes da Silva (UESB)

Dr. Leonardo Milani Avelar Rodrigues (UESB)

Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2018.

A todos as pessoas que dividem essa caminhada comigo e a tornam mais leve. A minha família, noivo e amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que Ele me proporciona até aqui e por todas as pessoas que tornam meus dias e conquistas mais especiais.

A minha família (minha base): meus pais Paulo e Graça, pelo amor, cuidado e incentivo, em todas as etapas da minha vida; aos meus irmãos, Melque, Phablo e Maiko, minhas cunhadas, Bárbara e Walesca, meu sobrinho Theo, pelos momentos de alegria e luz, que tanto ajudam a me manter firme.

A Francklin, meu noivo, amigo e companheiro, por todo amor, carinho, força e paciência, por acreditar sempre em mim.

A todos os familiares, que mesmo longe, transmitem tanto carinho.

A meus amigos de infância que Deus permite que ainda os tenham presentes na minha vida, mesmo longe, trazendo alegria aos meus dias. Ao meu amigo de sempre Taffarel, Tio Orlando e Tia Marisa por todo carinho, quero tê-los sempre na minha caminhada. Minhas amigas desde a graduação com quem divido as aflições, preocupações, dúvidas, mas principalmente muita alegria e cumplicidade: Fabíola, Dani e Acsinha.

A Ordem das Filhas de Jó Internacional e minhas irmãs de ordem, por todo aprendizado que sem dúvidas levarei para sempre comigo.

A FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo apoio técnico e administrativo, e a todos os docentes, técnicos e colegas do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da UESB.

A meu orientador, Prof^o Dr. Marcelo Franco, por todo aprendizado, compreensão, paciência e oportunidade de trabalhar com pessoas tão maravilhosas.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Nivio Batista Santana e as professoras: Dra. Julieta Rangel de Oliveira e Dra. Elizama Aguiar, pela orientação e toda ajuda ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat): Guega, Nadabe (Nah), Aila, Zana, Ane, Tati, Edvan, José Lucas, Lucas, Pedro (agregado), Maiara, Franciele, Najila, Cintia, Adriana, Mariana, Talita, Bene,

George, Márcio, Lorena (garotinha), Cleub, Hanna. Vocês são incríveis! Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão maravilhosas pra dividirem comigo esta caminhada, os dias e noites no laboratório se tornaram mais leves e felizes ao lado de vocês, que não pouparam esforços pra repassarem seus ensinamentos, alegria e companheirismo.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dra. Andrea Gomes da Silva e Dr. Leonardo Milani Avelar Rodrigues, que gentilmente aceitaram participar, contribuir e auxiliarem no desenvolvimento da dissertação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2.1 Fermentação em estado sólido para produção de enzimas	3
1.2.2 Aspectos gerais da casca da amêndoa do cacau	4
1.2.3 Fungo <i>Penicillium roqueforti</i>	7
1.2.4 Endo-1, 4- β -glucanase (EG)	8
1.2.5. Endoglucanase e suas aplicações na FES	10
1.3 OBJETIVOS	13
1.3.1 Objetivo geral	13
1.3.2 Objetivos específicos	13
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2 - Utilização da casca da amêndoa do cacau como fonte de baixo custo para produção de endoglucanase por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 em fermentação em estado sólido	22
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.2.1 Obtenção e preparo do resíduo	24
2.2.2 Obtenção e cultivo do micro-organismo.....	25
2.2.3 Preparo do inóculo	25
2.2.4 Fermentação em estado sólido.....	26
2.2.5 Extração enzimática.....	26
2.2.6 Determinação da atividade de endoglucanase	26
2.2.7 Planejamento e otimização da produção de endoglucanases.....	27
2.3 RESULTADOS	28
2.4 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO 3 - Propriedades bioquímicas de endoglucanases produzidas por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 utilizando o resíduo casca da amêndoa do cacau	38
3.1 INTRODUÇÃO.....	40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1 Material biológico.....	40
3.2.2 Produção e extração de endoglucanase.....	41
3.2.3 Atividade de endoglucanase	41
3.2.4 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade.....	42
3.2.5 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade.....	42
3.2.5 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos	42
3.2.6 Efeito de diferentes solventes	43
3.2.7 Estimativa dos parâmetros cinéticos.....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.3.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade.....	43
3.3.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade.....	45
3.3.3 Efeito da presença de diferentes sais e compostos orgânicos.....	46
3.3.4. Estabilidade a diferentes solventes	48
3.3.4 Estimativa dos parâmetros cinéticos.....	49
3.4 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fermentação em estado sólido por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 realizada em frascos Erlenmeyer utilizando casca da amêndoa do cacau e água como meio de cultivo.....	9
Figura 1.2 Partes da amêndoa do cacau.....	5
Figura 1.3 Esquema da obtenção do resíduo da casca da amêndoa do cacau, durante a produção de chocolate.....	6
Figura 1.4 Ação das celulasas sobre a molécula de celulose.	6
Figura 1.5 Comparação entre as estruturas da enzima endoglucanase e a exoglucanase.....	6
Figura 2.1 Resíduo da casca da amêndoa do cacau utilizado como substrato na FES para produção de endoglucanase por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110.	25
Figura 2.2 Gráfico de Pareto apresentando a significância dos termos das variáveis: tempo de fermentação (t), atividade de água (A_w), Temperatura de incubação ($^{\circ}C$), e no modelo ajustado para produção de endoglucanase por <i>P. roqueforti</i> ATCC10110.....	30
Figura 2.3 Gráfico de valores observados x previstos (a) gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado.....	31
Figura 2.4 Gráfico de superfície de resposta e de contorno construídos representando as interações entre as variáveis: a) Tempo x Atividade de água; b) Tempo x Temperatura e c) Temperatura x Atividade de água, tendo-se como resposta a atividade de endoglucanase Y_{UIg}	32
Figura 3.1 Atividade de endoglucanase obtida em diferentes Temperaturas.....	44
Figura 3.2 Perfil de estabilidade a Temperatura da endoglucanase obtida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de casca da amêndoa de cacau.....	44
Figura 3.3 Atividade de endoglucanase obtida em diferentes pH.....	45
Figura 3.4 Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase obtida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de casca da amêndoa de cacau.....	46
Figura 3.5 Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática da endoglucanase produzida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 em FES sobre o resíduo de casca da amêndoado cacau.....	50
Figura 3.6 Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para estimação de K_M e $V_{Máx}$	50

LISTA DE TABELA

Tabela 1.1 Estudos realizados para obtenção de endoglucanase por fermentação em estado sólido.....	12
Tabela 2.1 Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de endoglucanase utilizando casca da amêndoa de cacau.....	27
Tabela 2.2 Matriz do tipo Box-Behnken para a análise dos fatores: tempo de fermentação (t, h), atividade de água (A_w), Temperatura (T, °C) sobre a atividade de endoglucanase (Y) produzida por <i>P. roqueforti</i> ATCC10110.....	29
Tabela 2.3 ANOVA para o modelo reduzido ajustado.....	30
Tabela 3.1 Atividade de endoglucanase de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos.....	47
Tabela 3.2 Valores das atividades da endoglucanase frente a diferentes solventes	50

RESUMO

OLIVEIRA, P. C. **Produção e caracterização física e química de endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 a partir de fermentação em estado sólido da casca da amêndoa do cacau.** Itapetinga-BA: UESB, 2018. 67 p.

Nos últimos anos, estas enzimas têm recebido crescente atenção devido à possibilidade de aplicação em diversos processos industriais. No presente estudo, é descrito a produção de endoglucanases por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por meio da fermentação em estado sólido empregando-se a casca da amêndoa do cacau (*Theobroma cacao* L.) e água como alternativa aos meios de cultura comerciais. As endoglucanases são um grupo de enzimas hidrolíticas com a função de iniciar a clivagem da molécula de celulose, diminuindo o grau de polimerização da mesma e facilitando a ação das outras celulasas. Para os testes de fermentação, foram avaliados os parâmetros temperatura de incubação, atividade de água e tempo de fermentação, através do planejamento experimental Box-Behnken. Utilizando o resíduo em questão nas condições de 72 horas, 0,964 de atividade de água e 30 °C foi obtido uma máxima atividade de endoglucanase de 0,89 UI/g. O extrato enzimático bruto foi utilizado para determinação da estabilidade quanto ao efeito das variações da temperatura e pH, adição de íons metálicos e compostos orgânicos sobre a atividade de endoglucanase. As endoglucanases apresentaram maior atividade em pH 5 e temperatura de 50°C. Melhor estabilidade foi alcançada em pH na faixa de 5-7 e temperaturas $\leq 70^{\circ}\text{C}$. A adição dos íons Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e dos compostos Trolox e SDS ao extrato bruto resultaram em aumento da atividade enzimática, enquanto que Mn^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , EDTA e Triton X-100 comportaram-se como inibidores. Em relação à estabilidade a diferentes solventes, o diclorometano e o hexano comportaram-se como ativadores da endoglucanase, aumentando a atividade da enzima em 5, 42 e 1,18%, enquanto o metanol, acetona e éter etílico tiveram efeito ativador moderado. O estudo das melhores condições para ótima produção enzimática, bem como a estabilidade e efeitos frente a situações físicas e químicas analisadas indicam que a endoglucanase estudada no presente trabalho possui ótimo desempenho e aplicação promissora na indústria.

Palavras-chave: Celulase. Enzimas. Resíduos agro-industriais.

ABSTRACT

OLIVEIRA, P. C. **Production and physical and chemical characterization of *Penicillium roqueforti* endoglucanase ATCC 10110 from solid-state fermentation of the cocoa shell.** Itapetinga-BA: UESB, 2018. 67 p.

In recent years, these enzymes have received increasing attention due to the possibility of application in several industrial processes. In the present study, the production of endoglucanases by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 is described by solid-state fermentation using the bark meal of the cocoa shell (*Theobroma cacao* L.) and water as an alternative to the commercial culture media. Endoglucanases are a group of hydrolytic enzymes with the function of initiating the cleavage of the cellulose molecule, reducing the degree of polymerization thereof and facilitating the action of the other cellulases. For the fermentation tests, the parameters incubation temperature, water activity and fermentation time were evaluated through the Box-Behnken experimental design. Using the residue in question under conditions of 72 hours, 0.964 of water activity and 30 ° C a maximum endoglucanase activity of 0.89 IU/g was obtained. The crude enzymatic extract was used to determine the stability of the effect of variations in temperature and pH, addition of metal ions and organic compounds on endoglucanase activity. Endoglucanases showed higher activity at pH 5 and temperature of 50°C. Better stability was achieved at pH in the range of 5-7 and temperatures ≤ 70 . The addition of the Mg²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ and Trolox and SDS compounds to the crude extract resulted in increased enzymatic activity, whereas Mn²⁺, Pb²⁺, Ca²⁺, EDTA and Triton X-100 behaved as inhibitors. In relation to the stability to different solvents, dichloromethane and hexane behaved as endoglucanase activators, increasing the activity of the enzyme in 5, 42 and 1.18%, while methanol, acetone and ethyl ether had a moderate activating effect. The study of the best conditions for optimum enzymatic production, as well as the stability and effects of the analyzed physical and chemical conditions indicate that the endoglucanase studied in the present study had excellent performance and promising application in the industry.

Key words: Cellulases. Enzymatic hydrolysis. Agro-industrial wastes.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, atenção crescente foi dedicada às celulasas devido à diversidade de suas aplicações, como reciclagem de papel, lavanderia, processamento de algodão, produção de biocombustíveis, processamento de alimentos, além de aplicações farmacêuticas (HUANG et al. 2015). A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) estima que, até 2030, a contribuição global da biotecnologia será de US\$ 1 trilhão/ano, distribuído entre os setores de saúde (US\$ 260 bilhões/ano), produção primária (US\$ 380 bilhões/ano) e industrial (US\$ 420 bilhões/ano). Além disso, esse mesmo estudo estima que 80 % dos produtos farmacêuticos até 2030 passarão a ser desenvolvidos com o uso de biotecnologia (DIAS e CARVALHO, 2017). Embora a maioria das enzimas sejam produzidas por meio de técnicas de fermentação submersa, a fermentação de estado sólido (FES) ganhou interesse renovado pelos pesquisadores para a produção de enzimas devido às suas vantagens econômicas e de processo (USTOK et al.2007; CHUTMANOP et al.2008 ANTOINE et al., 2010).

A fermentação de estado sólido (FES) envolve o crescimento de microorganismos (principalmente fungos) em substratos sólidos e úmidos sem fase aquosa livre, tornando a FES diferente da fermentação submersa (ABDELJALIL et al., 2014). Apresenta várias vantagens, por exemplo, produtividades elevadas, estabilidade prolongada de produtos e baixos custos de produção, colocando SSF como a técnica preferida para campos especiais de aplicação como a produção de enzimas e a utilização de resíduos neste bioprocessamento tem sido considerada uma alternativa para reduzir problemas de poluição ambiental (OBEROI, 2010). A procura por novos microrganismos produtores e a adequação necessária ainda da composição dos meios e condições de cultivo é, então, constante. Estudos de otimização dos parâmetros envolvidos no processo que influenciam o crescimento microbiano e a produção das enzimas são necessárias para auxiliar nesta busca. (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

Do ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluentes produzidos e a possibilidade de realizar o processo sob condições

não estéreis. Outra vantagem é o uso de resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, etc.) (FARINAS et al., 2011). A indústria de alimentos é um dos maiores produtores de significativa quantidade de subprodutos, no Brasil. A sua grande disponibilidade e baixo valor agregado tornam a sua aplicação em bioprocessos bastante viável (FERREIRA et al., 2011).

O Cacau (*Theobroma cacao* L.) é o fruto originário da árvore do cacauzeiro, importante cultura em vários países tropicais (OKIYAMA et al., 2017). Tem seu cultivo destinado para vários fins como, produção de pastas e gorduras e seus compostos aplicados na indústria farmacêutica, mas principalmente para a produção de um dos alimentos mais apreciados mundialmente, o chocolate (SILVEIRA et al., 2017). Sua amêndoa comercialmente valiosa, constitui em cerca de 10% do peso fresco do cacau. A casca da amêndoa do cacau é um co-produto da indústria do processamento da amêndoa do cacau e é considerado um resíduo fibroso, com alto potencial para ser utilizado na FES, rico em compostos químicos de alto valor nutricional tendo aumentado o seu interesse por parte de pesquisadores que estudam a sua aplicabilidade e justificando a sua utilização neste trabalho. (OKIYAMA et al., 2017)

A celulose é um dos principais componentes estruturais dos resíduos lignocelulósicos, biomaterial mais renovável escolhido como fonte de carbono por uma ampla gama de microorganismos celulolíticos, incluindo fungos e bactérias. Trata-se do mais abundante recurso renovável natural do planeta e a produção de energia a partir de biomassa lignocelulósica é uma rota alternativa com grande potencial, debatida em todo o mundo (FARINAS et al., 2011). Para o maior e melhor rendimento final, é necessário um tratamento de hidrólise destes componentes, resultando na total conversão em açúcares glicosídicos, e para tanto, são estudadas a ação de enzimas e suas condições de trabalhos. Estes estudos são de grande importância para a economia e eficiência de processos industriais. O presente estudo tem o objetivo de analisar a endoglucanase e suas melhores condições de hidrólise para maior atividade enzimática.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Fermentação em estado sólido para produção de enzimas

A Fermentação em estado sólido – FES pode ser definida como um bioprocessamento que consiste no cultivo de micro-organismos sobre suportes sólidos úmidos, inertes ou em substratos insolúveis que podem ser utilizados como fonte de nutrientes e energia. Esta técnica é realizada quase na ausência de água livre, simulando o ambiente natural que muitos fungos, bactérias e leveduras estão adaptados. No entanto, é necessário que o substrato possua umidade suficiente para suportar o crescimento e atividade metabólica dos micro-organismos (HOLKER et al., 2004; PANDEY 2003).

Nas últimas décadas, a FES tem atraído crescente atenção para a produção de enzimas e vem sendo bastante apontada como uma alternativa à fermentação submersa (FS), cuja técnica consiste no cultivo de micro-organismos na presença de excesso de água. Cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, o que torna difícil generalizar uma das técnicas como a mais apropriada para produção de enzimas. Entretanto, a FS geralmente envolve altos custos de produção que podem contribuir para inviabilidade econômica do processo (ANG et al., 2013; PANDEY et al., 1999). Dentre as vantagens apresentadas pela FES podem-se destacar a capacidade de fornecer uma alta produtividade de fermentação, menores custos de produção, meios de fermentação mais simples, concentração elevada do produto final, menor geração de águas residuais, além de produção de enzimas com propriedades funcionais adequadas para aplicações industriais, como, por exemplo, estabilidade a temperaturas mais altas e resistência ao pH (MITCHELL et al., 2000; COUTO e SANROMAN, 2006; WANG et al., 2008). Outro aspecto que favorece o emprego da FES é a possibilidade de utilização de resíduos de origem agro-industrial como matéria prima barata, que são, de forma desordenada, descartados na natureza, como representado na **Figura 1.1**. Durante a FES os resíduos de origem agro-industrial são utilizados como substratos, os quais se comportam como fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes que são importantes para o desenvolvimento dos micro-organismos que realizam a fermentação (LI e ZONG, 2010; KIRAN et al., 2014).

Figura 1.1 Fermentação em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110 realizada em frascos Erlenmeyer utilizando casca da amêndoa do cacau e água como meio de cultivo.



Fonte: Arquivo pessoal.

Baseado na grande capacidade de crescer na ausência de água livre, os fungos filamentosos são os micro-organismos mais utilizados nos processos no estado sólido, e apresentarem versatilidade em suas aplicações, além de sua facilidade de adaptação e manipulação (COSTA, 1996). Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZE, 2004).

Existem dois tipos de hifas dos fungos filamentosos que representam o seu crescimento em FES, denominadas da seguinte forma: 1) hifas aéreas; 2) hifas penetrativas. As hifas aéreas aparecem sobre a interface ar-líquido e as hifas penetrativas estão em contato direto com o substrato.

1.2.2 Aspectos gerais da casca da amêndoa do cacau

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é o nome dado ao fruto do cacaueiro. Suas sementes são comumente chamadas de amêndoa de cacau e consistem em uma concha exterior ou testa em torno de dois cotilédones e um pequeno gérmen. Os principais países produtores de grãos de cacau são Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria, Equador, Camarões e Brasil, contribuindo com quase 90% da produção total do mundo. No Brasil, para 2016/17 as estimativas de produção de cacau foram de uma safra 21% superior, de 190 mil toneladas. O *International Cocoa Organization* ICCO também atualizou suas estimativas para a demanda mundial nesta temporada. De acordo com o

órgão, a estimativa de produção foi de 4,242 milhões de toneladas da amêndoa ao longo do ano-safra 2016/17, crescimento de 2,9% ante o ciclo anterior. Já para a produção mundial seria de 4,552 milhões de toneladas. A casca da amêndoa do cacau (**Figura 1.2**) é removida juntamente com o gérmen e antes ou após a torrefação e os fragmentos quebrados de cotilédones, livre da casca, são chamados de nibs e são utilizados na produção de chocolate (BECKETT, 2008-2009).

Figura 1.2 Partes da amêndoa do cacau.

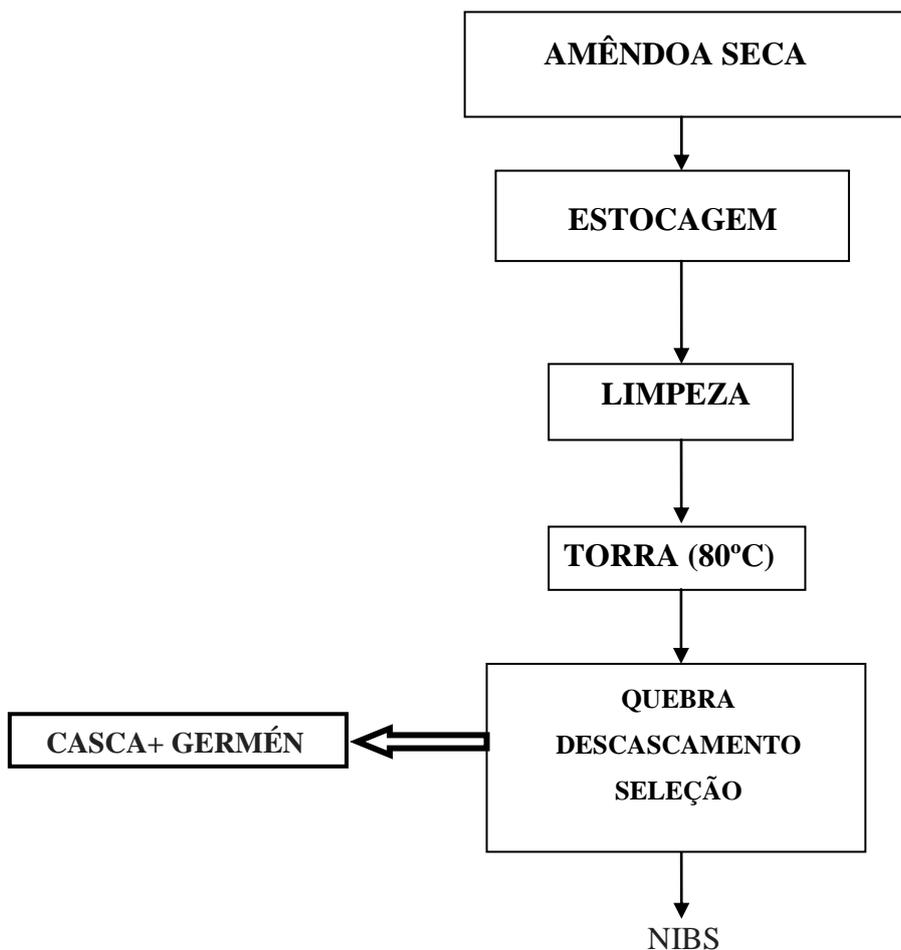


Fonte: Adaptado por Robert (2012)

Na cultura do cacau, apenas as amendoas (~ 10% de peso fresco do cacau) são comercialmente valiosos. Os frutos maduros do cacau são colhidos e abertos para extrair os grãos úmidos. Após a fermentação da polpa circundante, as amendoas secas são utilizadas como forma comercial de cacau, empregados principalmente para a indústria do chocolate, mas também para as indústrias farmacêutica e cosmética. (VRIESMANN et al., 2011) . Durante o processo de fermentação, a polpa que envolve a amêndoa é degradada pela ação de bactérias ácido lácticas e leveduras naturalmente presentes no ambiente, aumentando para até 50 °C a sua temperatura de fermentação. A formação de ácido pode diminuir o pH, que juntamente com o aumento de temperatura, é responsável pela morte do embrião e a acidificação do tecido armazenado, permitindo a perda de membranas de permeabilidade seletiva e conseqüentemente as enzimas em contato com substratos. Essas enzimas endógenas são responsáveis pelos precursores de sabor em chocolate (SILVEIRA et al., 2017). As cascas são sub exploradas e consideram um desperdício indesejável da indústria do cacau/chocolate por proporcionarem sabor final desagradável ao produto. Através da **Figura 1.3** a etapa de

obtenção da casca da amêndoa do cacau, considerada pela indústria um resíduo, é apresentada.

Figura 1.3 Esquema da obtenção do resíduo da casca da amêndoa do cacau, durante a produção de chocolate.



Fonte: Própria autora

Considerando a produção mundial de cacau, a geração mundial desses resíduos pode ser calculada aproximadamente 700 mil toneladas, que é uma quantidade substancial (Organização internacional de Cacau, 2016). No entanto, o desperdício é ainda mais significativo ao saber que esse montante pode ser maior se considerando que ao longo do processamento, possivelmente, parte do germen que está ligado a casca são removidos. Recentemente, o valor dos subprodutos agrícolas, como o cacau, recebeu atenção crescente devido à escassez de recursos e sérios problemas ambientais. Muitos

pesquisadores buscam propor o uso desses subprodutos em aplicações como ingredientes alimentares ou outras aplicações de valor agregado (JAHURUL et al., 2013; YUSOF, KHANAHMADI, AMID, e MAHMOD, 2016).

1.2.3 Fungo *Penicillium roqueforti*

Fungos filamentosos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e uma grande variedade de metabólitos. São conhecidas diversas fontes de compostos bioativos e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos fúngicos, que teve início há muitos anos atrás, ainda continua muito ativa (ARCHER et al., 2008; SUN et al., 2010).

O nome genérico *Penicillium* foi introduzido há mais de 200 anos atrás com o significado de escova" e descrevia apenas três espécies: *P. expansum*, *P. glaucum* e *P. candidum*. Desde então, mais de 1000 espécies foram introduzidas ao gênero. Porém, algumas dessas espécies deixaram de pertencer ao gênero em vista de não haver descrições completas por critérios modernos e outros são agora considerados sinônimos de outras espécies. Atualmente, existem cerca de 35429 espécies aceitas para esse gênero, inclusive a espécie *P. roqueforti* (VISAGIE et al., 2014). O gênero *Penicillium* é classificado cientificamente como pertencente ao filo Ascomycota, classe Eurotomycetes, ordem Eurotiales e da família Trichocomaceae (PITT, 2002) e comum em substratos com altos níveis de ácidos orgânicos, altas concentrações de dióxido de carbono e baixos níveis de oxigênio (SAM SON et al., 2002).

P. roqueforti é um fungo saprofítico amplamente distribuído na natureza podendo ser encontrado em solos de florestas, madeiras, silagens, ambientes lácteos e é também um agente de deterioração comum em alimentos refrigerados, carnes e produtos de trigo (GILLOT et al. 2015). Do ponto de vista morfológico, é um fungo de crescimento rápido que apresenta colônias de coloração verde escura quando crescidas em extrato de malte e ágar. Estas colônias são caracterizadas por moderar a produção de conídios de coloração turquesa acinzentada ou verde maçante às margens da colônia. Os conidióforos são formados a partir de hifas superficiais e os estipes têm paredes muito ásperas, que carregam grandes terminais penicillia (ABBAS e DOBSON, 2011).

O crescimento de um micro-organismo, assim como a formação de um produto, ocorre como resposta às condições ambientais, e deste modo é essencial a compreensão

da relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico. A temperatura para o crescimento dos fungos fica entre 0°C e 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20°C e 30°C. O pH em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies (PUTZKE, 2004). O *P. roqueforti* possui muitas características favoráveis à fermentação, que incluem a capacidade de utilizar pentoses e hexoses como substrato e a tolerância a condições severas como baixas temperaturas (cresce vigorosamente entre 4 e 35°C), baixos níveis de oxigênio (o crescimento não é afetado em concentrações de oxigênio acima de 4,2 %), altas concentrações de dióxido de carbono e resistência ao pH (entre 3 e 10) e ácidos orgânicos (ABBAS e DOBSON, 2011).

1.2.4 Endo-1, 4-β-glucanase (EG)

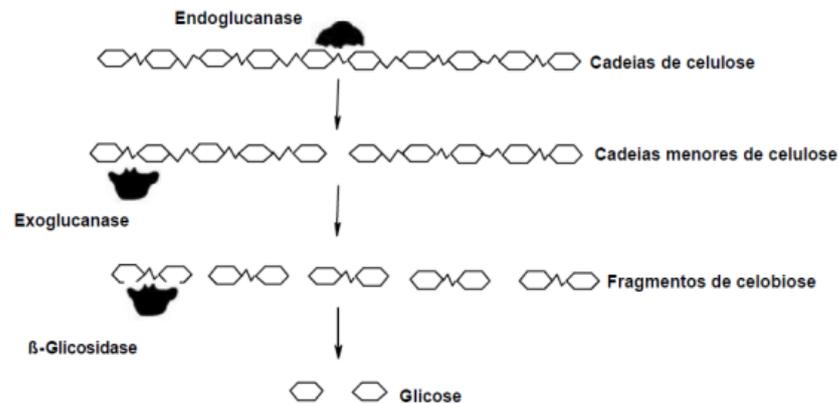
A parede celular vegetal é constituída em cerca de 35 - 50% de celulose (um polímero de D-glucose), 25-30% de hemicelulose (um polímero de 49 açúcares) e 15-30% de lignina (RIBEIRO et al., 2017). A celulose é o maior polissacarídeo produzido pelos vegetais, composto por uma longa cadeia linear e plana de moléculas D-glicose que se ligam por ligações glicosídicas β-1,4, são encontradas na parede celular das plantas conferindo as mesmas, resistência e proteção osmótica. Por se tratar de uma molécula complexa, é necessário um conjunto de enzimas que atuem sinergicamente na sua degradação.

A Endo-1,4-β-glucanase (EG), chamada de modo simples endoglucanase, quebra aleatoriamente ligações intermoleculares β-1,4-glicosídica na parte interna da cadeia de celulose. A ação das endoglucanases são normalmente avaliadas pela redução de viscosidade na solução de carboximetilcelulose (CMC). A Endoglucanase, que está classificada com o EC 3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), 1,4-β-D-glucana-4-glucano-hidrolase.

É a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, como se observa na **Figura 1.4**, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um

não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (LYND et al., 2002).

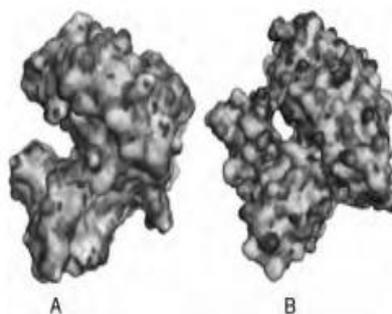
Figura 1.4 Ação das celulasas sobre a molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de Wright et al., 1988.

Geralmente seu sítio ativo consiste em um sulco aberto, ou em forma de fenda, que permite a acomodação da cadeia linear de celulose aleatoriamente (**Figura 1.5**). Para se ligar efetivamente ao sítio ativo da enzima, a molécula do substrato interage com múltiplos subsítios (de 4 a 7 aproximadamente), via interações de hidrogênio e/ou empilhamento dos resíduos aromáticos com aminoácidos do sítio ativo. O modo de ação das endoglucanases e exoglucanases diferem no local e como irão degradar de forma específica por hidrólise (PAUL et al., 2013).

Figura 1.5 Comparação entre as estruturas da enzima endoglucanase e a exoglucanase.



Estrutura (A) é de uma endoglucanase pertencente à família-6 endo e possui uma profunda fenda no sítio ativo, a estrutura (B) é de uma exoglucanase “Cel6A” de

Humicola insolens (código PDB: 1BVW), em que o sítio ativo dele possui um loop estendido que forma um túnel. Fonte: ZHANG, 2013.

As exocelulases ou exoglucanases também são conhecidas como células de celulose e atuam nos terminais das cadeias de oligossacarídeos geradas pelas endocelulases, liberando glicose ou celobiose. Desta forma, as celulasas são capazes de quebrar as ligações glicosídicas de microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos e na melhoria da digestibilidade da celulose (DILLON, 2004).

1.2.5. Endoglucanase e suas aplicações na FES

As enzimas são usadas para catalisar reações de vários processos em muitos setores industriais, como têxteis, papel, produtos farmacêuticos, alimentos e ração animal. Mais de 500 enzimas diferentes são aplicadas em mais de 50 processos biotecnológicos (ADRIO; DEMAIN, 2014). No entanto, o número de produtores de enzimas é pequeno e o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de enzimas eficientes em grande escala é estratégico para países em desenvolvimento (ZANELATO et al., 2012).

As celulasas são enzimas hidrolíticas do complexo celulolítico que clivam as ligações O-glicosídicas da celulose, sendo divididas em três grupos, de acordo com o seu local de ação no substrato celulósico: endoglucanases (EnG), que dão início à hidrólise e clivam ligações internas da fibra celulósica, na região amorfa; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e b-glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. A Enzyme Cod codifica estas enzimas com a seqüência 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO et al., 2010).

Os estudos de produção de celulase são de importância crítica devido à influência destas enzimas na economia da bioconversão biológica em combustíveis e outros produtos químicos (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). Endoglucanases (EC 3.2.1.4) constituem uma grande proporção do grupo de enzimas coletivamente conhecidas como celulasas, que são as 3 maiores enzimas vendidas em todo o mundo e têm aplicações em várias indústrias (SAQIB et al., 2012).

Sua demanda está aumentando rapidamente, especialmente devido ao surgimento de indústrias avançadas de biocombustíveis de segunda geração que exigem enormes quantidades de enzimas em seus processos (WILSON, 2009; YEOMAN et al., 2010)

Para diminuir os custos do processo e aumentar a eficiência, é desejável utilizar enzimas termostáticas nos processos industriais (YEOMAN et al., 2010). No entanto, a maioria das celulasas não é estável em altas temperaturas (KARNCHANATAT et al., 2008), e uma série de esforços estão sendo feitos para obter celulasas termostáticas (YEOMAN et al., 2010).

A fermentação em estado sólido (FES) há muito tempo tem sido utilizada para a produção de celulasas e outras enzimas ou bioprodutos (SAQIB et al., 2012). O FES é particularmente vantajoso para a produção de enzimas por fungos filamentosos, pois simula o habitat natural desses microrganismos (PIROTA, 2016).

A produção desta enzima foi estudada em muitos fungos filamentosos, particularmente nos grupos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CHELLAPANDI, 2008). O nível das enzimas produzidas por essas culturas é maior do que os obtidos com leveduras e bactérias. Na **Tabela 1.1**, alguns estudos encontrados na literatura para produção de endoglucanase em diferentes tempos e temperaturas de fermentação em estado sólido, bem como diferentes fungos.

Nos processos biotecnológicos, as matérias-primas naturais, ou resíduos recicláveis como lignina, farelo, farinha de trigo, farinha de arroz, algodão, extrato de levedura, pó de soja, melão de beterraba, amido e celulose são amplamente utilizados como substrato (ALJAMMAS et al., 2017).

Tabela 1.1 Estudos realizados para obtenção de endoglucanase por fermentação em estado sólido.

Resíduos	Microrganismos	Tempo de Fermentação (horas)	Temperatura de incubação (°C)	Referências
Farelo de Trigo	<i>Aspergillus niger</i>	72	32	Pirota et al. 2013
Pera espinhosa	<i>Rhizopus sp.</i>	68,12	30,41	Santos et al. 2016
	<i>Aspergillus niger</i>	70,35	29,56	
Palha de trigo cortada	<i>Aspergillus fumigatus</i>	168	30	Saqib et al. 2012
Casca de laranja, flor seca e bagaço de cana	<i>Rhizopus oryzae</i>	48	37	<u>Karmakar e Ray</u> 2010
Ervas Chinesas	<i>Trichoderma virride</i>	72	30	Longwei et al. 2014
Grão de milho moído	<i>Aspergillus níger</i>	72	32	Farinas et al. 2011
Farelo de Trigo	<i>Aspergillus oryzae</i>	72	35	Pirota et al. 2016
Bagaço de cana de açúcar	<i>Myceliophthora sp.</i>	18	50	Zanelato et al. 2012
Farelo de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	168	50	Dave et al. 2013
Palha de arroz e palha de trigo	<i>Fomitopsis sp.</i>	264	30	Deswal et al. 2011
Farelo de trigo	<i>Aspergillus. niger</i>	72	32	Farinas et al. 2011

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Obter endoglucanase fúngica produzida por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por fermentação em estado sólido, através da otimização do processo, usando como substrato a casca da amêndoa do cacau e caracterizar química e fisicamente a enzima visando sua aplicação na indústria.

1.3.2 Objetivos específicos

- Verificar o potencial do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 como agente fermentador e o resíduo de casca da amêndoa do cacau como meio de cultura para produção de endoglucanases por fermentação em estado sólido;
- Estudar os parâmetros de fermentação: tempo de incubação, atividade de água inicial e temperatura sobre a produção de endoglucanases e determinar a condições que levam a maximização da produção enzimática;
- Caracterizar as propriedades cinéticas e físico-químicas das endoglucanases obtidas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*. In: FUQUAY JW. Encyclopedia of Dairy Sciences. San Diego: Academic Press, ed. 2, p. 772–775. 2011.

ABDELJALIL S.; SAIBI W.; HMAD I.B.; BAKLOUTI A.; MAHMOUD F. B.; BELGHITH H. and GARGOURI A. Improvement of cellulase and xylanase production by solid-state fermentation of *Stachybotrys microspora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.61, n. 4, p. 432-440, 2014.

ADRIO, J. L. and DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**. v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

ALJAMMAS, H.A., FATHI, H.A., ALKHALAF, W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. **Journal of genetic engineering and biotechnology**. 2017.

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, n. 9, p. 1293-1302, 2013.

ANTOINE AA1, JACQUELINE D, THONART P. Xylanase production by *penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 160, n. 1, p. 50-62, 2010.

ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 111, p. 99 -147, 2008.

BECKETT, S. T. The science of chocolate. Cambridge: RSCPublishing. ed 2, 2008.

BECKETT, S. T. Industrial chocolate manufacture and use. WileyBlackwell. ed. 4, 2009.

BRIJWANI, K., OBEROI, H.S., VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochem.** v. 45, n. 1, p. 120–128, 2010.

CASTRO A. M.; PEREIRA N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, v.33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHELLAPANDI P.; HIMANSHU M. J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Braz. J. Microbiol.** v.39, n.1, p. 122-127, 2008.

CHUTMANOP, J., CHUICHULCHERM, S., CHISTI, Y., SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical technology and biotechnology.* v. 83, n. 7, p. 1012-1018, 2008.

COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus Niger* NRRL 3122 em fermentação semi sólida de farelo de arroz.** Tese - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 203f. 1996.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A Review. **Journal of Food Engineering, Califórnia**, v. 76, n. 3, p. 291302, 2006.

DAVE, B.R., SUDHIR, A.P., PARMAR, P., PATHAK, S., RAYKUNDALIYA, D.P, SUBRAMANIAN, R.B.. Enhancement of cellulase activity by a new strain of *thermoascus aurantiacus*: optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** v. 2, n. 2, p. 108-115, 2013.

DIAS, R. F.; de CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 1, p 410-430, 2017.

DILLON A. Cellulases. In: *Enzymes as agents Biotechnology*, p. 243-270, 2004.

DESWAL D. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 10, p. 6065-6072, 2011.

DOBREV G. T.; ZHEKOVA B. Y.; Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. **Braz. J. Microbiol.** v.43, n.1, p. 70-77, 2012.

FARINAS C. S.; SCARPELINI L. M.; MIRANDA E. A. and BERTUCCI NETO V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 28, n. 01, p. 17- 26, 2011.

FERREIRA, A. N., PACHECO, C. S. V, TAVARES, I. M. C, ROCHA, T. J. O., FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

GILLOT, G. et al. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. **Plos one**. v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl microbiol biotechnol.** v. 64, n. 2, p. 175-86, 2004.

HUANG S.; DENG G.; YANG Y.; WU Z; WU L. Optimization of Endoglucanase Production from a Novel Bacterial Isolate, *Arthrobacter sp.* HPG166 and

characterization of Its Properties. **Braz. arch. biol. Technol.** v.58, n.5, p. 692-701, 2015.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Production of cocoa beans. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, XLII. 2016.

JAHURUL, M. H. A., ZAIDUL, I. S. M., NORULAINI, N. A. N., SAHENA, F., JINAP, S., AZMIR, J., ET AL. Cocoa butter fats and possibilities of substitution in food products concerning cocoa varieties, alternative sources, extraction methods, composition, and characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 467 e 476, 2013.

LONGWEI G., HONGMAN C., HUIHUI W., GUOSHI, K., DAMING R. Optimization of state-solid conditions for the production of cellulose and its hydrolytic potentials by *Trichoderma virride* Sn-0196. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 26, p. 2547-2554, 2014.

KARNCHANATAT A, PETSOM A, SANGVANICH P, *et al.* A novel thermostable endoglucanase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 42, n. 5, p. 404–413, 2008.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 903-917, 2014.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D., OLESKOWICZ-POPIEL, P., SIMMONS, B.A., BLANCH, H.W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnol Bioeng**. v. 109, n. 4, p. 1083-7, 2012.

KLEMAN-LEYER, K. M.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T. T.; KIRK, T. K. The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size. **App. Environ. Microbiol.** v. 62, n. 8, p. 2883, 1996.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Biol. Rev.** v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MALHERBE, S. and CLOETE, T.E.. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** v. 1, n. 2, p. 105-114, 2002.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solidstate fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scaleup of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Solid-State Fermentation Bioreactors. Ed. Springer, p.19, 2006.

OBEROI H. S.; CHAVAN Y.; BANSAL S.; DHILLON G. S. Production of Cellulases through Solid State Fermentation Using Kinnow Pulp as a Major Substrate. **Food Bioprocess Technol.** v.3, n. 4, p.528–536, 2010.

OKIYAMA D.C.G.; NAVARRO S.L.B.; RODRIGUES C.E.C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Food Science & Technology.** v. 63, p. 103 e 112, 2017

PANDEY, A. Solid-state Fermentation, Biochemical. **Engineering Journal**, vol. 13, 81-84 (2003).

PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 2, p. 107-115, 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PIROTA, R. D. P. B., MIOTTO, L. S., DELABONA, P. S., FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Braz. J. Chem. Eng.** v.30, n.1, p. 117-123, 2013.

PIROTA, R. D. P. B., TONELOTTO, M., DELABONA, P. S., FONSECA, R. F., PAIXÃO, D. A. A., BALEEIRO, F. C. F., BERTUCCI NETO, V., FARINAS, C. S. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 33, n. 1, p. 21-31, 2016 .

PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, p. 197, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2 ed., v.1, p.605, 2004.

RIBEIRO, L.S., de MELO ÓRFÃO, J.J., PEREIRA, M.F.R. Direct catalytic production of sorbitol from waste cellulosic materials. **Bioresource Technology**. v. 232, p. 152-158, 2017.

SANTOS, T.C.; REIS, N. S; SILVA, T. P.; FRANCO M. Prickly Palm Cactus Husk as a Raw Material for Production of Ligninolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Sci. Biotechnol.** v. 25, n. 1, p. 205-211, 2016.

SAQIB, A.A, FAROOQ, A., IQBAL, M., HASSAN, J.U., HAYAT, U., BAIG, S. A. Thermostable crude endoglucanase produced by *aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Res.**v. 2012, n. 2012, p. 6, 2012.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. Centraal bureau voor schimmel cultures barn delf. ed. 4, p.322, 1995.

SILVEIRA, P.T.S; MELO, L.J.P.; SOUZA, L.S; BISPO, E.S.; SOARES, S.E. Protease prospecion and determination of its isoenzymes activity in cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.). **Food Sci. Technol**, v.37, n.3, p. 369-377, 2017.

SUN, R. et al. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia cortícola*. *Phytochemistry Letters*, p. 101-105, 2010.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 322-334, 2007.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 78, p. 343-371, 2014.

VRIESMANN, L.C., AMBONI, R.D.M.C., PETKOWICZ, C.L.O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, n. 4, p. 1230-1236, 2011.

WANG, Q.; HOU, Y.; XU, Z.; MIAO, J.; LI, G. Optimization of coldactive protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1926-1931, 2008.

WILSON DB. Cellulases and Biofules. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20, n. 3, p. 295–299, 2009.

YEOMAN CJ, HAN Y, DODD D, SCHROEDER CM, MACKIE RI, CANN IK. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**. v. 70, p. 1–55, 2010.

YUSOF, F., KHANAHMADI, S., AMID, A., & MAHMOD, S. S. Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. **Springer Plus**, v. 5, n. 1, p, 1, 2016.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. i-1d3b in a packed bed solid state fermentor. **Braz. J. Microbiol.** v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.

ZHANG, Y.; YAN, S.; YAO, L. Mechanism of the *humicola insolens* cel7b e197s mutant catalyzed flavonoid glycosides synthesis: a qm/mm metadynamics simulation study. **Theoretical chemistry accounts**. v. 132, n. 1367, p. 10, 2013.

CAPÍTULO 2

Utilização da casca da amêndoa do cacau como fonte de baixo custo para produção de endoglucanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido

Resumo: Nos processos biotecnológicos, a aplicação enzimática está relacionada aos principais custos operacionais, tornando-se um ponto crítico no processamento. O sucesso do uso de enzimas em uma aplicação específica depende do uso de processos mais eficientes e substratos mais baratos para produção. Baseado nos custos das matérias-primas nestes processos que representam cerca de 10 a 30% dos custos totais, substratos alternativos são propostos para a produção de enzimas. A produção de enzimas a partir da fermentação em estado sólido por fungos filamentosos é bastante vantajosa devido ao processo simular o habitat natural dos microrganismos. Entretanto é necessária a caracterização em termos de temperatura, quantidade de água e tempo. Diante do exposto o presente estudo avaliou a utilização do resíduo de casca da amêndoa do cacau como substrato alternativo para produção de endoglucanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica, localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Os ensaios de fermentação foram realizados utilizando o resíduo como matriz. Os parâmetros tempo de incubação, atividade de água e temperatura de fermentação foram otimizados utilizando planejamento Box-Behnken e análise por metodologia de superfície de resposta. A atividade máxima observada, utilizando o resíduo, para a endoglucanase foi de 0,89 UI/g sob as condições de tempo de fermentação, atividade de água e temperatura de incubação de 72h, 0,964 a_w e 30°C, respectivamente.

Palavras-chave: Produção de enzima. Endoglucanase. Planejamento BoxBehnken. *Penicillium roqueforti*.

**Cocoa shell as low cost raw material for the production of endoglucanase by
Penicillium roqueforti ATCC 10110 in solid state fermentation**

Abstract: In the biotechnological processes, the enzymatic application is related to the main operating costs, becoming a critical point in the processing. The success of using enzymes in a specific application depends on the use of more efficient processes and cheaper substrates for production. Based on the costs of the raw materials in these processes that represent about 10 to 30% of the total costs, alternative substrates are proposed for the production of enzymes. The production of enzymes from the solid state fermentation by filamentous fungi is quite advantageous due to the process simulate the natural habitat of the microorganisms. However, the characterization in terms of temperature, amount of water and time is required. This study evaluated the use of the residue of peanut meal of the cocoa shell as an alternative substrate for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation. The experiments were conducted at the Laboratory of Biotransformation and Organic Biocatalysis, located at the State University of Santa Cruz - UESC. The fermentation tests were performed using the residue as matrix. The parameters incubation time, water activity and fermentation temperature were optimized using Box-Behnken planning and analysis by response surface methodology. The maximum activity observed using the residue for endoglucanase was 0.89 IU / g under the conditions of fermentation time, water activity and incubation temperature of 72h, 0.964 to w and 30°C, respectively.

Keywords: Enzyme production. Endoglucanase. Planning BoxBehnken. *Penicillium roqueforti*.

2.1 INTRODUÇÃO

A lignocelulose é a fonte de carbono sustentável mais importante que está emergindo como fonte renovável de energia. As lignoceluloses são compostas por três componentes principais, incluindo celulose, hemicelulose e lignina. Nos últimos anos, a atenção crescente foi dedicada às celulasas, principais enzimas responsáveis pela degradação dos materiais lignocelulósicos, devido à diversidade de suas aplicações, como reciclagem de papel, lavanderia, processamento de algodão, produção de biocombustíveis, processamento de alimentos, além de aplicações farmacêuticas (PRADEEP e NARASIMHA 2011, ACHARYA e CHAUDHARY 2012).

A importância do tempo de fermentação está relacionada à disponibilidade de nutrientes e outras condições naturais, para o crescimento microbiano e produção de enzimas. A produção de enzimas é lenta no início e depois acelera até atingir um valor máximo e, a partir daí, a concentração de produtos gerados reduz a atividade da mesma. (SANTOS et al., 2016).

Uma vez que as enzimas celulósicas são usadas em uma ampla variedade de aplicações industriais, a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas do substrato também está crescendo rapidamente (SHAHZADI et al., 2014). As celulasas são enzimas indutíveis e sintetizadas por uma grande diversidade de microorganismos, incluindo fungos e bactérias (ABDEL-FATAH et al., 2012).

A otimização estatística dos processos tem vantagens em comparação com a prática clássica de mudar uma variável de cada vez, como o menor número de experimentos e a possibilidade de avaliar os efeitos de interação entre as variáveis. Neste contexto, objetiva-se com este trabalho otimizar a produção de endoglucanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido utilizando resíduo de casca da amêndoa do cacau.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção e preparo do resíduo

As amostras de resíduo de cacau foram fornecidas por uma fábrica de chocolate, localizada na região do sul da Bahia, Brasil. O resíduo proveniente da etapa de quebra

da amêndoa do cacau, foi triturado em moinho de facas tipo Willye, até uma granulometria de 2 mm (**Figura 2.1**).

Figura 2.1 Resíduo da casca da amêndoa do cacau, triturado e utilizado como substrato na FES para produção de endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Obtenção e cultivo do micro-organismo.

O micro-organismo utilizado para os ensaios de fermentação foi o *Penicilium roqueforti* ATCC 10110, o qual foi obtido da coleção de micro-organismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil) sob o registro de número 40074 e lote 041140074. Este fungo foi preservado em meio de sílica e glicerol a -80°C em ultra freezer. O repique das cepas foi feita em meio de cultura de Agar dextrose-potato (PDA) em placas de Petri, previamente esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. As placas inoculadas foram incubadas em câmara de germinação BOD, com temperatura controlada de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 7 dias ou até esporulação abundante (observado visivelmente devido a coloração verde da colônia).

2.2.3 Preparo do inoculo

O preparo da suspensão de esporos foi realizado utilizando-se o microorganismo cultivado em meio PDA, por 7 dias a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa

em solução Tween 80 (0,01%, v/v), ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em tubo de ensaio para a contagem do número de esporos em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer.

2.2.4 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas em incubadora BOD com temperatura controlada utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL como biorreator e o farelo da casca da amêndoa de cacau como único substrato. Cada frasco contendo 5g de resíduo foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 15 min. Em seguida, o material foi disposto em cabine de segurança biológica sob incidência de luz ultravioleta até seu resfriamento. Foi inoculado ao meio a quantidade de 10^7 esporos por grama de substrato e água destilada esterilizada foi adicionada até atingir umidade desejada.

2.2.5 Extração enzimática

Após a etapa de fermentação, foram adicionados aos meios fermentados 5 mL de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,0) para cada 1 g de resíduo. A mistura foi mantida em incubadora com agitação orbital (Shaker), por 10 minutos a 170 rpm e 27°C. O conteúdo inteiro de cada frasco foi prensado (prensa mecânica) através de gaze, para separar o sólido do extrato enzimático. O filtrado foi coletado e centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando-se a parte sobrenadante, a qual foi denominada extrato enzimático bruto.

2.2.6 Determinação da atividade de endoglucanase

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos com base em procedimentos padrão recomendados pela IUPAC (GHOSE e BISARIA, 1987). A atividade de endoglucanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de 0,1 mL de carboximetilcelulose (CMC), na concentração de 1% (m/v), com 0,5 mL do extrato enzimático bruto em banho-maria a 50°C, por 15 minutos. Para o controle da reação foram incubados 0,1 mL e tampão

acetato de sódio com 0,5 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído). Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método de MILLER (1959), adicionando-se 0,2 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) aos meios de reação, seguido de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda a 540 nm e a quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada usando curva padrão de glicose.

Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g).

2.2.7 Planejamento e otimização da produção de endoglucanases

Foi utilizado o planejamento Box-Behnken para investigar a influência de diferentes fatores sobre a produção de endoglucanases e também determinar os níveis mais adequados desses fatores para alcançar a máxima produção enzimática. Uma matriz foi empregada para avaliar a utilização do substrato. A matriz consistiu de 15 experimentos, incluído de três réplicas no ponto central para estimar o erro experimental, avaliar efeitos quadráticos, lineares e de interação das variáveis para ajustar um modelo de segunda ordem com termos quadráticos. A atividade de endoglucanases (UI/g) foi aplicada como valor de resposta e os fatores atividade de água (A_w) temperatura de incubação (°C) e tempo de fermentação (h), foram analisados como variáveis independentes, sendo estudados em três níveis, baixo, médio e alto, que foram codificados como -1 0 e +1, respectivamente. Os valores reais e codificados podem ser observados na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de endoglucanase utilizando casca da amêndoa do cacau.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Tempo de fermentação (h)	T	48	72	96
Atividade de água	A_w	0,937	0,964	0,984
Temperatura (°C)	T	20	30	40

A partir dos valores experimentais obtidos como resposta, foi construído um modelo polinomial de segunda ordem de acordo com a **Equação 2.1** para avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta, onde Y é a resposta, a_0 é o termo independente e a_i , a_{ii} e a_{ij} são os coeficientes de regressão linear, quadrático e de interação, respectivamente

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n a_{ij} x_i x_j$$

Eq.(2.1)

O nível de significância estatística do modelo gerado foi avaliado por análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$), os coeficientes de regressão foram avaliados a partir dos efeitos padronizados (com base em t-Student, $p < 0,05$) e a qualidade do modelo avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2 -adj) e teste de falta de ajuste. Foi utilizado o *software Statistica* para avaliar matematicamente as variações nos resultados, os dados dispostos na **Tabela 2.3** foram submetidos à análise de regressão para ajustar modelos polinomiais de segunda ordem. A significância estatística dos termos quadráticos, lineares e de interação (linear x linear) foi disposta em forma de gráfico de Pareto (**Figura 2.2**). Uma vez que os modelos apresentaram termos não significativos, os coeficientes de regressão destes termos foram removidos e novos modelos reduzidos foram construídos por análise de regressão e submetidos à ANOVA ($p < 0,05$) (**Tabela 2.4**) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

2.3 RESULTADOS

Os resultados experimentais obtidos a partir das condições do planejamento Box-Behnken aplicado para otimização da produção de endoglucanases empregando-se farelo da amêndoa de cacau podem ser observados a **Tabela 2.2**. Os valores da resposta são o resultado médio da triplicata realizada nos ensaios de determinação da atividade enzimática. A síntese de endoglucanase pelo fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 pode ser verificado.

Tabela 2.2 Matriz do tipo Box-Behnken para a análise dos fatores tempo de fermentação (t, h), atividade de água (A_w), temperatura (T, °C) e sobre a atividade de endoglucanase (Y) produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110.

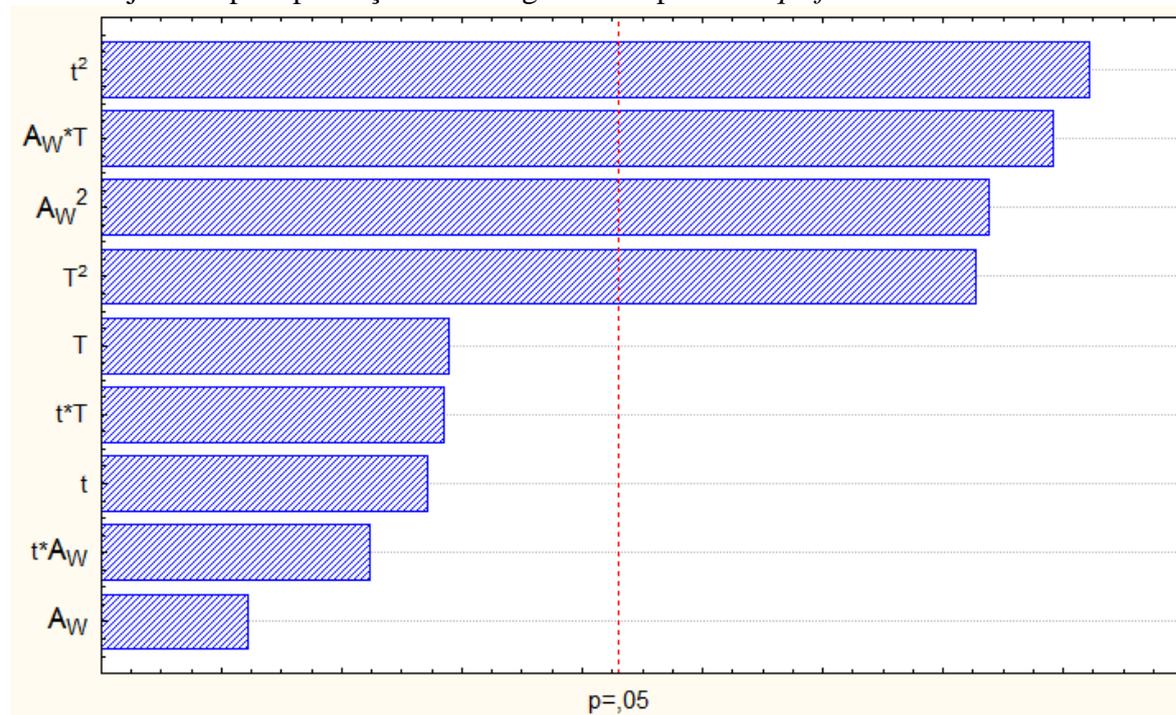
Experimento	T	A_w	T	Atividade Endoglucanase (UI/g)
1	-1	-1	0	0,585 ± 0,003
2	1	-1	0	0,439 ± 0,004
3	-1	1	0	0,536 ± 0,001
4	1	1	0	0,565 ± 0,007
5	-1	0	-1	0,526 ± 0,001
6	1	0	-1	0,546 ± 0,001
7	-1	0	1	0,634 ± 0,004
8	1	0	1	0,423 ± 0,017
9	0	-1	-1	0,526 ± 0,013
10	0	1	-1	0,731 ± 0,004
11	0	-1	1	0,682 ± 0,001
12	0	1	1	0,263 ± 0,006
13	0	0	0	0,829 ± 0,016
14	0	0	0	0,829 ± 0,005
15	0	0	0	0,897 ± 0,009

Apesar de ter se alcançado a produção da enzima sob as diferentes condições do planejamento, é possível observar que a variação dos níveis dos fatores não resultou em valores discrepantes de atividade de endoglucanase. Utilizando o farelo da casca de cacau como substrato, as condições dos experimentos 13, 14 e 15 resultaram em uma maior produção de endoglucanase, onde as variáveis tempo, atividade de água e temperatura, foram mantidas em 72h, 0,964 e 30°C, respectivamente. A maior produção da enzima foi alcançada quando as condições foram mantidas no ponto central, neste caso, tempo de 72h, atividade de água de 0,964 e temperatura a 30°C. Os resultados foram validados, com a repetição em triplicata dos valores críticos apontados pelo modelo através da **Equação 2.2** gerada.

$$Y(\text{U/g}) = 0,814 - 0,168 (t^2) - 0,152 (a_w^2) - 0,149 (T^2) - 0,156 (tT) \quad \text{Eq. (2.2)}$$

Admitindo um nível de confiança de 95%, representada pela linha vertical traçada, os termos t (tempo), A_w (atividade de água), T (temperatura) e a interação $A_w * T$ (atividade de água e temperatura) foram significantes. (**Figura 2.2**).

Figura 2.2 Gráfico de Pareto apresentando a significância dos termos das variáveis: tempo de fermentação (t), atividade de água (A_w) e temperatura de incubação (T), no modelo ajustado para produção de endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110.



Efeito padronizado (student-t)

O efeito significativo de todos os termos quadráticos sugeriu que as três variáveis investigadas foram críticas para a produção de endoglucanases, sendo a variável tempo a de maior influência. Uma vez que os modelos apresentaram termos não significativos, os coeficientes de regressão destes termos foram removidos e novos modelos reduzidos foram construídos por análise de regressão e submetidos à ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 2.3).

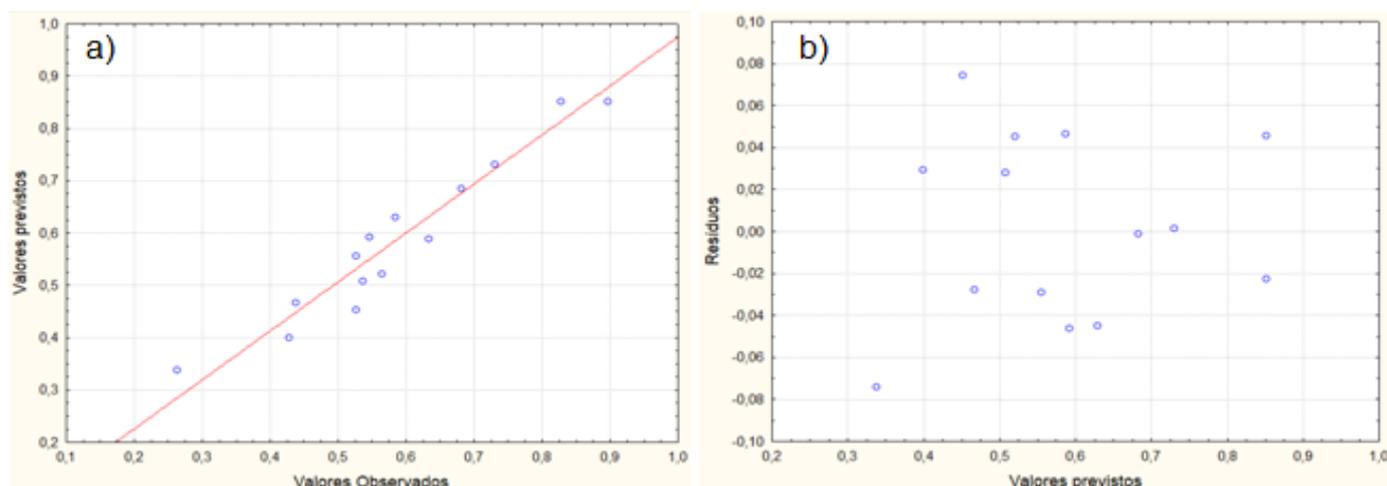
Tabela 2.3 ANOVA para o modelo reduzido ajustado.

	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Regressão	0,380	1	0,379982	147,2981	$p < 0,05$
Resíduo	0,0258	10	0,00258		
Total	0,406	11	0,036889	0,5	
Falta de ajuste	4,36E+11	4	1,1E+11		
Erro puro	4,36E+11	2	2,18E+11		

$R^2 = 0,9364$; R^2 -adj = 0,8219; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; P, probabilidade.

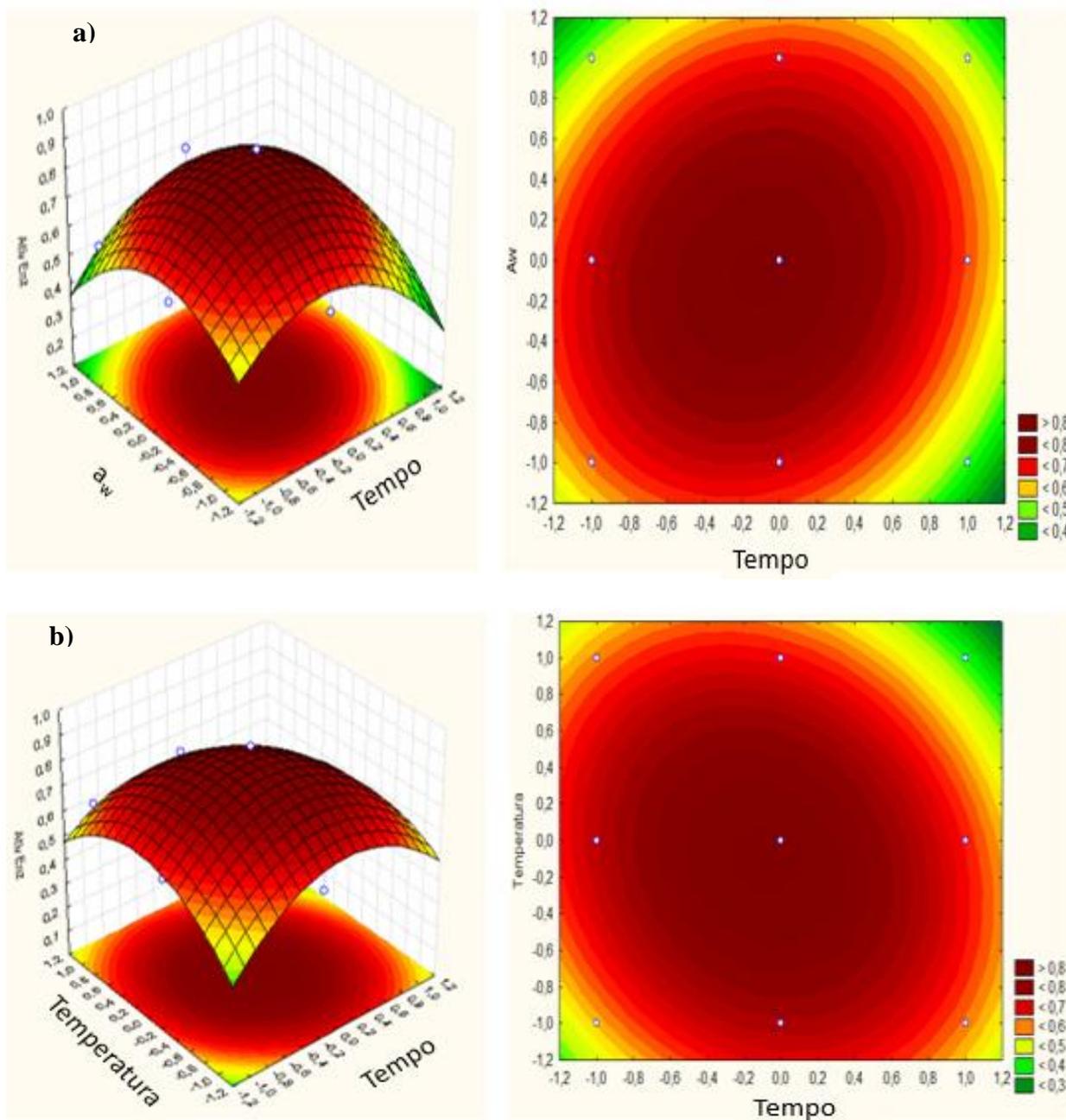
Os resultados apresentados na **Tabela 2.3** indicam que o modelo matemático construído ($p < 0,05$) foi estatisticamente significativo. Para o presente modelo, os valores de R^2 e R^2 -adj (0,9364 e 0,8219, respectivamente) indicam um bom ajuste aos resultados experimentais. A partir de um valor de R^2 de 0,9364 conclui-se que 93,64% da variabilidade das respostas de atividade de endoglucanase podem ser explicadas pelo modelo reduzido ao passo que um valor de R^2 de 0,8219 significa que 82,19% da variação das respostas de atividade de endoglucanase podem ser explicadas pelo modelo ajustado. Com base nas informações da Figura 2.3a, é perceptível que o modelo reduzido apresentou os valores das respostas reais, bem próximos aos valores previstos, o que condiz com os resultados de R^2 e R^2 -adj, propondo uma boa correlação entre os valores reais e previstos. Enquanto que, segundo o interpretado no gráfico de resíduos (**Figura 2.3**), é possível observar que os valores de resíduos foram relativamente baixos e dispostos de forma aleatória, concluindo assim, que o modelo é considerado adequado para a construção de superfícies de respostas e previsão das regiões esperadas.

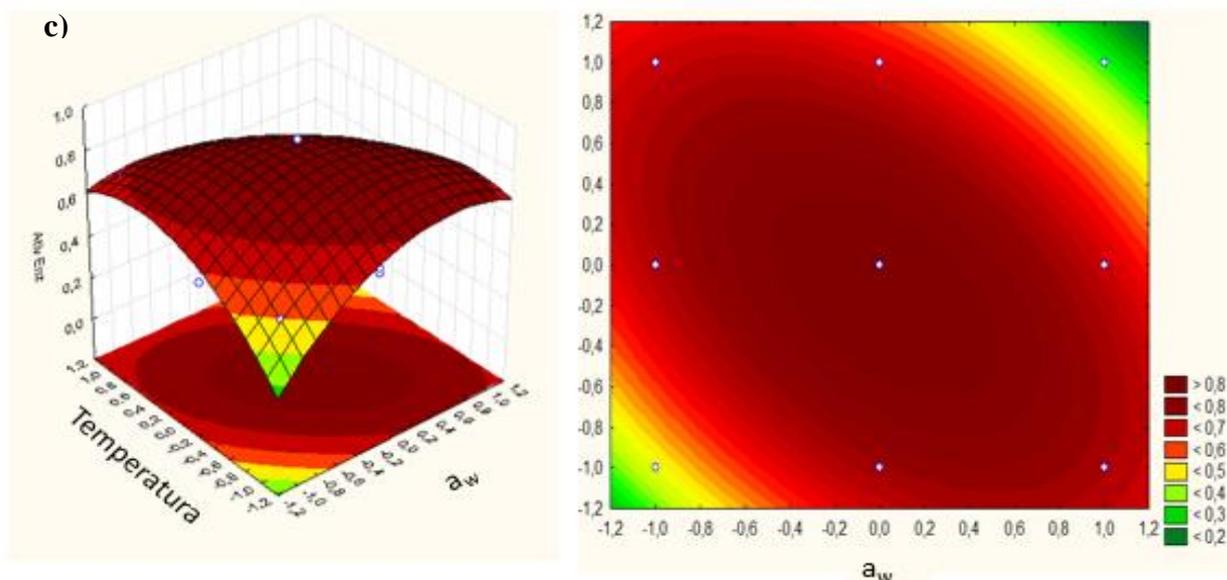
Figura 2.3 Gráfico de valores observados x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 2.4 Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos representando as interações entre as variáveis: a) Tempo x Atividade de água; b) Tempo x Temperatura e c) Temperatura x Atividade de água., tendo-se como resposta a atividade de endoglucanase $Y_{UI/g}$.





Fonte: Dados da Pesquisa

Com o aumento no tempo de fermentação resultou em uma maior atividade de endoglucanase, sendo apontado um decréscimo a partir de 72h e uma faixa de tempo de máxima produção nesse tempo. Em relação à variável temperatura, para a casca da amêndoa de cacau foi apontado uma melhor região para a produção de endoglucanase na região do nível central (30°C). PIROTA et al. (2013) e FARINAS et al. (2011) produziram a enzima endoglucanase em farelo de trigo por fermentação em estado sólido, também em um tempo e temperatura, ótimos de 72 horas a 32°C respectivamente, utilizando o *Aspergillus niger* como microrganismo. LONGWEY et al. (2014), utilizaram o *Trichoderma virride* em ervas chinesas para produzir endoglucanase nesse mesmo tempo e temperatura de 72 horas a 30°C.

Temperaturas muito baixas tendem a afetar negativamente o desenvolvimento microbiano, podendo ocorrer diminuição no seu metabolismo e conseqüentemente redução na produção enzimática. Enquanto que, em altas temperaturas os microorganismos canalizam a energia obtida do substrato para sintetizar apenas uma quantidade reduzida de proteínas necessárias para seu crescimento e processos fisiológicos, além disso, a desnaturação da enzima provocada altas temperaturas que provocam mudanças na sua estrutura tridimensional (PAL E KHANUM, 2010).

A temperatura afeta o metabolismo microbiano, regula o crescimento, a formação de esporos, a germinação e a formação do produto. No entanto, os espaços

entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão do oxigênio e a dissipação do calor (GERVAIS; MOLIN, 2003; SANCHEZ, 2009;).

Em FES, a atividade da água é importante na fermentação, ajudando a difusão de solutos e gases. Se a atividade da água não for suficiente, o metabolismo celular diminui, devido a alta de substratos (SILVA et al. 2016). Embora a atividade da água do meio possa ser atribuída à transferência de massa de água e solutos através das células microbianas, seu efeito na produção de enzimas foi menor em comparação a duração da fermentação.

2.4 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado foi possível obter endoglucanases de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por fermentação em estado sólido utilizando a casca da amêndoa do cacau, como resíduo e única fonte de nutrientes e energia.

A aplicação da metodologia de superfície de resposta utilizando uma matriz de planejamento Box-Behnken permitiu obter com êxito as condições das variáveis tempo de fermentação, atividade de água e temperatura de incubação, necessárias para maximização da produção de endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando o substrato investigado.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual Do Sudoeste da Bahia (UESB) e Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATAH OM, HASSAN MM, ELSHAFEI AM, HAROUN BM, ATTA HM, OTHMAN AM. Physiological studies on carboxymethyl cellulase formation by *Aspergillus terreus* DSM 826. **Braz J Microbiol.** v. 43, n. 1, p. 1-11, 2012.
- ACHARYA S, CHAUDHARY A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. **Braz Arch Biol Technol.** v. 55, n. 4, p. 497-503, 2012.
- ANWAR, Z., GULFRAZ, M., IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **J. Rad. Res. Appl. Sci.**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.
- FARINAS, C. S., SCARPELINI, L. M., MIRANDA, E. A., BERTUCCI NETO, V. AND COURI, S. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solidstate fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** v. 13, n. 1, p. 85-1, 2003.
- GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. **Pure Appl. Chem.** v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987.
- HUANG S.; DENG G.; YANG Y.; WU Z.; WU L. Optimization of Endoglucanase Production from a Novel Bacterial Isolate, *Arthrobacter* sp. HPG166 and Characterization of Its Properties. **Braz. arch. biol. technol.** v.58, n. 5, p. 17-26, 2015.
- LONGWEI G., HONGMAN C., HUIHUI W., GUOSHI, K., DAMING R. Optimization of state-solid conditions for the production of cellulose and its hydrolytic potentials by

Tricoderma virride Sn-0196. **African Journal of Microbiology Research**. v. 8, n. 26, p. 2547-2554, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PAL A. e KHANUM F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* dfr-5 through solid-state-fermentation. **Bioresour technol**. v. 101, n. 19, p. 7563-9, 2010.

PIROTA, R. D. P. B., MIOTTO, L. S., DELABONA, P. S., FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Braz. J. Chem. Eng.** v.30, n.1, p. 117-123, 2013.

PRADEEP MR, G NARASIMHA. Utilization of Pea Seed Husk as a Substrate for Cellulase Production by Mutant *Aspergillus niger*. **Insight Biotech**. v. 1, n. 2, p. 17-22, 2011.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**., v. 27, n. 2185-94, 2009.

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

SANTOS, T.C.; REIS, N. S; SILVA, T. P.; FRANCO M. Prickly Palm Cactus Husk as a Raw Material for Production of Ligninolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Sci. Biotechnol**. v. 25, n. 1, p. 205-211, 2016.

SANTOS, T.C., REIS, N.S., SILVA, T.P. BONOMO, R.C.F., OLIVEIRA, E.A., OLIVEIRA, J.R., FRANCO, M. Production, Optimization and Partial Characterization of Enzymes from Filamentous Fungi Using Dried Forage Cactus Pear as Substrate. **Waste and Biomass Valorization**. v. 9, n. 4, p. 571–579, 2018.

SHAHZADI T, MEHMOOD S, IRSHAD M, ANWAR Z, AFROZ A, ZEESHAN N, et al. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Adv Biosci Biotech.** v. 5, n. 3, p. 246-251, 2014.

CAPÍTULO 3

Propriedades bioquímicas de endoglucanases produzidas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizando o resíduo casca da amêndoa do cacau

Resumo: As celulasas têm várias aplicações. No entanto, existem alguns critérios importantes para sua aplicação nas indústrias. Objetivou-se a partir deste estudo, investigar as propriedades cinéticas e o efeito da temperatura, pH, adição de íons metálicos e congelamento sobre a atividade de endoglucanases produzidas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido utilizando como resíduo a casca da amêndoa do cacau e água como meio de cultura. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica, localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Os ensaios foram realizados utilizando-se o extrato enzimático bruto obtido a partir do meio fermentado após 72h de fermentação. Foi alcançada uma maior atividade de endoglucanase em pH 5 e temperatura de 50°C durante a reação, foram adequadamente estáveis em pH na faixa de 5-7 e temperaturas $\leq 70^\circ\text{C}$ após armazenamento por 5 h. A adição dos íons Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} dos compostos Trolox e SDS ao extrato bruto resultou em aumento da atividade enzimática, enquanto que as espécies Mn^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , EDTA e Triton X-100 comportaram-se como inibidores. Em relação à estabilidade frente a diferentes solventes, diclorometano e hexano se comportaram como ativadores da endoglucanase, aumentando a atividade da enzima em 5, 42 e 1,18%, enquanto metanol, acetona e éter etílico tiveram efeito ativador, moderado. Os valores aparentes de K_M e $V_{Máx}$, foram 1,17 mg/mL e 0,90 mg/mL/min, respectivamente. A endoglucanase, portanto, pode ser empregada de forma viável na indústria, apresentando atividades superiores a enzimas puras e em condições economicamente favoráveis de faixa de pH, temperaturas e diferentes solventes.

Palavras-chave: Estabilidade. Endoglucanase. Parâmetros cinéticos. pH. Temperatura.

**Biochemical properties of endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti*
ATCC 10110 using cocoa shell residue as a substrate**

Abstract: Cellulases have several applications. However, there are some important criteria for their application in industries. The objective of this study was to investigate the kinetic properties and the effect of temperature, pH, metal ion addition and freezing on the activity of endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation using cocoa shell and water as culture medium. The experiments were conducted at the Laboratory of Biotransformation and Organic Biocatalysis, located at the State University of Santa Cruz - UESC. The assays were performed using the crude enzyme extract obtained from the fermented medium after 72 hours of fermentation. Increased endoglucanase activity at pH 5 and temperature of 50 ° C during the reaction, were suitably stable at pH in the range of 5-7 and temperatures \leq 70 ° C after storage for 5 h. The addition of the Mg²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ions of the Trolox and SDS compounds to the crude extract resulted in increased enzymatic activity, whereas the Mn²⁺, Pb²⁺, Ca²⁺, EDTA and Triton X-100 species behaved as inhibitors. In relation to the stability to different solvents, dichloromethane and hexane behaved as endoglucanase activators, increasing the activity of the enzyme in 5, 42 and 1.18%, while methanol, acetone and ethyl ether had an activator effect, moderate. The apparent values of K_M and $V_{Máx}$ were 1.17 mg / mL and 0.90 mg / mL / min, respectively. Endoglucanase, therefore, can be employed in a viable way in the industry, presenting activities superior to pure enzymes and in economically favorable conditions of range of pH, temperatures and different solvents.

Keywords: Stability. Endoglucanase. Kinetic parameters. PH. Temperature.

3.1 INTRODUÇÃO

Em bioprocessos e aplicações industriais modernas, as enzimas muitas vezes precisam ter algumas propriedades únicas, como alta estabilidade térmica, tolerância ao sal, estabilidade do pH, tolerância ao metal pesado e resistência a meios ácidos ou alcalinos em condições extremas. No entanto, uma grande desvantagem para aplicações industriais é que a maioria das celulasas de origem fúngica carece de estabilidade térmica a alta temperatura (ACHARYA e CHAUDHARY 2012).

Uma vez que a maioria dos processos industriais é realizada a altas temperaturas, as aplicações industriais das celulasas de origem fúngica são correspondentemente limitadas (ACHARYA e CHAUDHARY 2011). Muitos estudos têm elucidado como as celulasas interagem com os seus substratos, bem como os ativadores e os inibidores dessa reação. Esses estudos são bastante relevantes no contexto industrial já que íons metálicos presentes em equipamentos, gerados por corrosão, por exemplo, podem influenciar na atividade da enzima.

Celulasas são um complexo de enzimas que atuam sinergicamente para degradar celulose insolúvel em fermentação de açúcares fermentescíveis solúveis e são utilizadas em vários setores industriais como a de detergente, têxtil e de alimentos (PODREPSEK et al., 2012; GRAMINHA et al., 2008). Endoglucanases (EG, endo-1,4- β -endoglucanases, E.C. 3.2.1.4) atuam na fração amorfa da fração da celulose através de hidrólise, reduzindo a complexa molécula em oligossacarídeos diminuindo o seu grau de polimerização (PAYNE et al., 2015).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar as características bioquímicas das endoglucanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido, utilizando casca da amêndoa do cacau como substrato.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

A cepa de *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizada neste trabalho foi obtida da coleção de micro-organismos do INCQS/Fiocruz (Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) sob o registro de número 40074 e lote 041140074. Para o preparo do inóculo, a cultura esporulada do fungo com 7 dias de incubação (em meio PDA) foi suspensa em Tween

80 (0,01%) e a contagem do número de esporos foi realizada utilizando câmara de Neubauer e microscópio binocular. As amostras de resíduo de cacau foram fornecidas por uma fábrica de chocolate, localizada na região do sul da Bahia, Brasil. O resíduo proveniente da etapa de torragem da amêndoa do cacau, foi triturado em moinho de facas tipo Willye, com abertura de 2 mm.

3.2.2 Produção e extração de endoglucanase

Os ensaios de fermentação foram realizados em Erlenmeyers contendo 5 g de resíduo de casca da amêndoa de cacau autoclavado e resfriado sendo adicionados água até atingir uma atividade de água de 0,964. Foram inoculados (10^7 esporos/g de resíduo). Os cultivos foram conduzidos em ambiente de incubadora BOD, a 30°C, por 72 h. Após o processo fermentativo, os meios fermentados foram submetidos a uma extração utilizando solução tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0), seguida por filtração e centrifugação, 704.34 g por 5 minutos. A parte sobrenadante, denominada extrato enzimático bruto, foi coletada e utilizada para os ensaios de atividade enzimática.

3.2.3 Atividade de endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada a partir da quantidade de açúcares redutores liberados após a incubação de 0,1 mL de carboximetil celulose (Sigma®), 1% (m/v) em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0), com 0,5 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído) em banho-maria a 50°C por 15 minutos. Para o controle da reação foram incubados 0,1 mL de tampão acetato de sódio com 0,5 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído). Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método de MILLER (1959), adicionando-se 0,2 mL de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) aos meios de reação seguidos de incubação em água fervente por 5 minutos. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e convertida em atividade endoglucanásica a partir da curva padrão de glicose (0 a 1 $\mu\text{mol/mL}$).

3.2.4 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade

A determinação da temperatura ótima de reação para a atividade de endoglucanase foi realizada em meio padrão para determinação da atividade enzimática (item 3.2.3), porém, utilizando-se diferentes temperaturas de incubação (4 a 80°C). As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo o maior resultado obtido considerado como 100%. A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) sob diferentes temperaturas (40 a 80°C) por 5 h. Alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 h e submetidas à determinação da atividade de endoglucanase. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

3.2.5 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade

O efeito do pH de reação foi investigado na faixa de 4 a 8. Para alcançar esses valores de pH foi necessário diluir o extrato enzimático bruto 10 vezes em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 4 a 5) e tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 6 a 8). A atividade da endoglucanase foi determinada em temperatura de 50°C e o resultado expresso como atividade relativa, sendo o maior resultado considerado como 100%.

Para os ensaios de estabilidade ao pH também foi necessária a diluição do extrato enzimático bruto. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 5 h e alíquotas foram retiradas em intervalos de 1 h e submetidas ao ensaio de atividade enzimática. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

3.2.5 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), Acetato de chumbo ($Pb(C_2H_3O_2)_2$), Sulfato de Cobre ($CuSO_4$), Nitrato de alumínio ($Al(NO_3)_3$), Carbonato de Sódio (Na_2CO_3), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dodecil sulfato de sódio (SDS), T-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) sobre a atividade enzimática.

Os ensaios consistiram em incubar o extrato enzimático bruto em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) com os aditivos por 15 min seguido da determinação da atividade de endoglucanase. Todos os compostos foram utilizados na concentração de 2 mmol/L de meio de reação e a atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade de endoglucanase obtida utilizando-se apenas o extrato enzimático bruto.

3.2.6 Efeito de diferentes solventes

Foram testados os solventes, acetona, diclorometano, éter etílico, hexano e metanol, onde foi adicionado a cada meio reacionário, 1 μ L de cada solvente para medida de atividade que foi determinada como anteriormente descrito. Sendo considerada como 100% a atividade de endoglucanase obtida utilizando-se apenas o extrato enzimático bruto.

3.2.7 Estimativa dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram estimados utilizando o extrato enzimático bruto contendo endoglucanase. A atividade da endoglucanase foi obtida a partir das condições de reação e meio utilizado para as outras análises, utilizando o modelo de Michaelis-Menten ($V_{M\acute{a}x}$ e K_m), ocorrendo apenas, a variação das concentrações do substrato carboximetilcelulose de “*beechwood*” (Sigma®) que variou numa faixa entre 1 e 20 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (K_M , mg/mL) e a velocidade máxima de reação ($V_{M\acute{a}x}$, μ mol/min/mL) foram estimadas pelo método de regressão de LINEWEAVER E BURK (1934)

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade

O efeito da temperatura foi avaliado para diferentes condições de temperaturas conforme a **Figura 3.1**, de onde se pôde observar que a atividade relativa de endoglucanase aumentou com o aumento da temperatura de reação até alcançar um

máximo em 50°C, sendo observado um declínio a partir desse valor. A termo-estabilidade de endoglucanases obtidas de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto na faixa de 40 a 80°C por 5 h (**Figura 3.2**).

Figura 3.1 Atividade de endoglucanase obtida em diferentes Temperaturas.

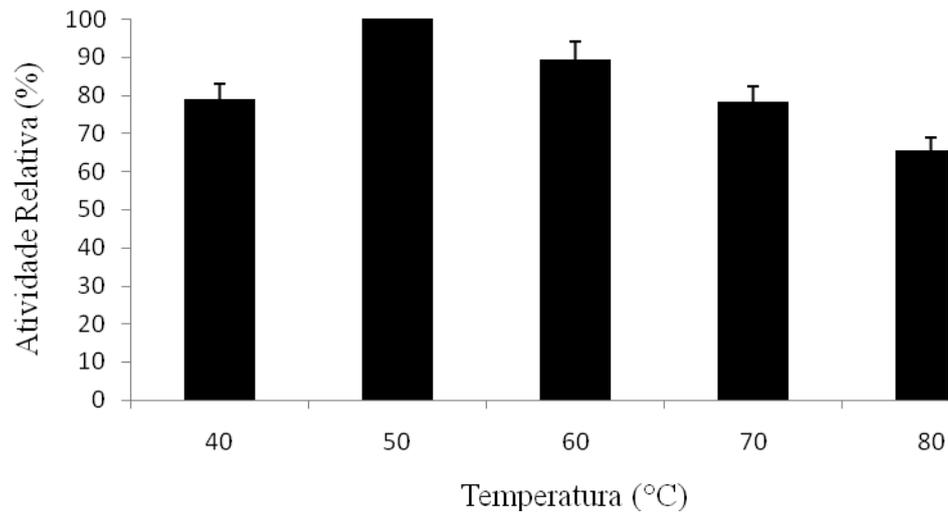
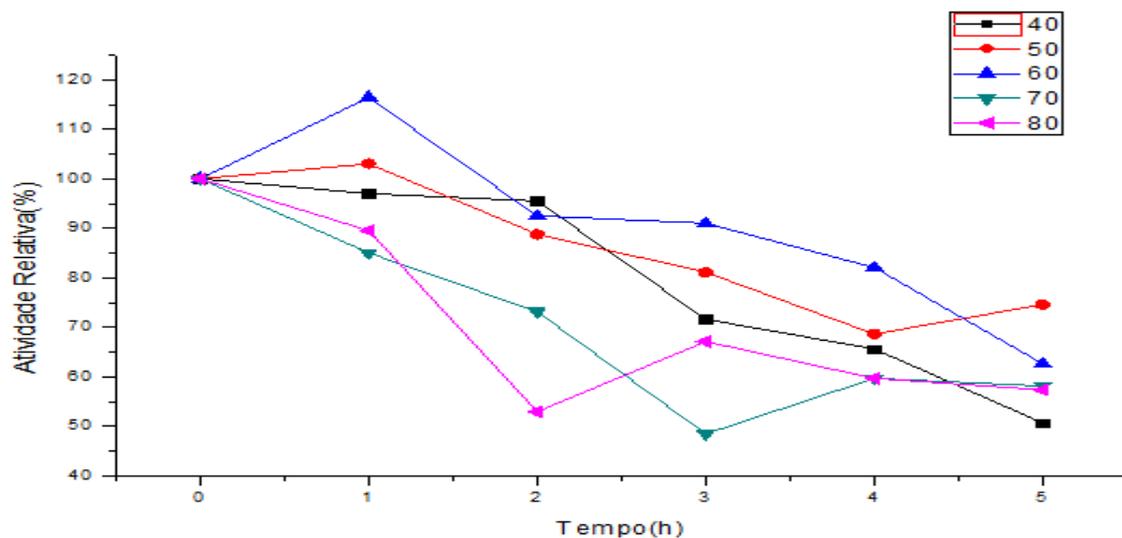


Figura 3.2 Perfil de estabilidade a Temperatura da endoglucanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de casca da amêndoa de cacau.



As atividades se mantiveram estáveis principalmente entre 50 e 60°C, onde as atividades ao final do tempo de incubação para cada um foram acima de 80% e em 70%, respectivamente. Apesar de um decaimento nas Temperaturas de 70°C em até 3

horas e 80°C em 2 horas, as atividades da enzima, ao final do tempo de 5 horas, se mantiveram para ambos em aproximadamente 65%. KAUR et al. (2007) observou que a endoglucanase foi estável a 50 e 60 °C durante 3 h, após 1 e 2 h, respectivamente, a 60 °C. HUANG et al. (2015), encontraram uma temperatura ótima de atividade de endoglucanase de 50 °C o mesmo autor encontrou uma estabilidade térmica nas temperaturas entre 65 e 70 °C utilizando endoglucanase da *Athrobacter sp* HPG166. POIDEVIN L. et al. (2013) registraram uma atividade ideal também a 50 °C e declinada posteriormente, enquanto o intervalo de estabilidade térmica da mesma enzima mostrou que era completamente estável a 50 °C, a atividade desta enzima diminuiu gradualmente com o aumento de temperatura entre 60 e 70 °C durante 1-2 h. DAVE, et al. (2015), encontraram aumento de atividade da endo- β -1,4-glucanase gradualmente com a elevação da temperatura até 70 °C declinando depois disso.

3.3.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade

O efeito do pH sobre a atividade de endoglucanase obtida de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi verificado na faixa de 4 a 8 (**Figura 3.3**). Máxima atividade enzimática foi observada no pH 5, não havendo diferença acentuada na faixa de 4 a 5. A atividade declinou cerca de 40% em valores de pH a partir de 7. Melhor atividade na faixa de acidez sugeriu tratar-se de endoglucanases acidófilas.

Figura 3.3 Atividade de endoglucanase obtida em diferentes pH.

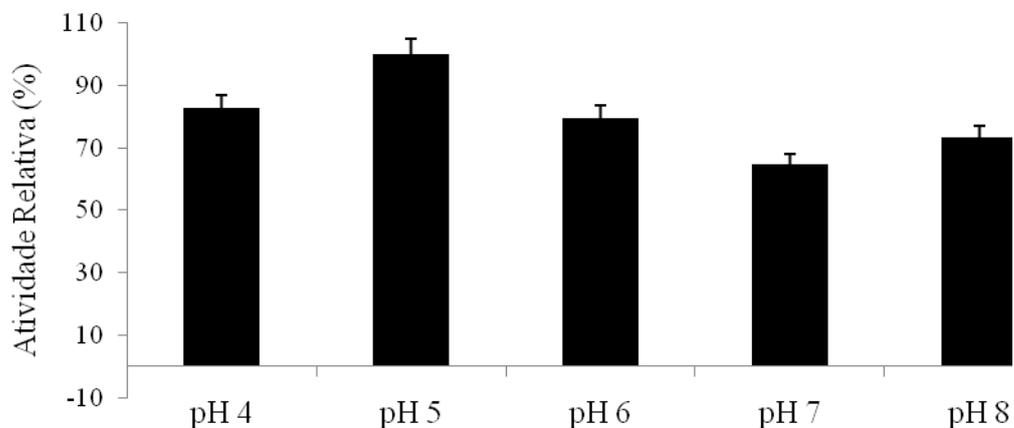
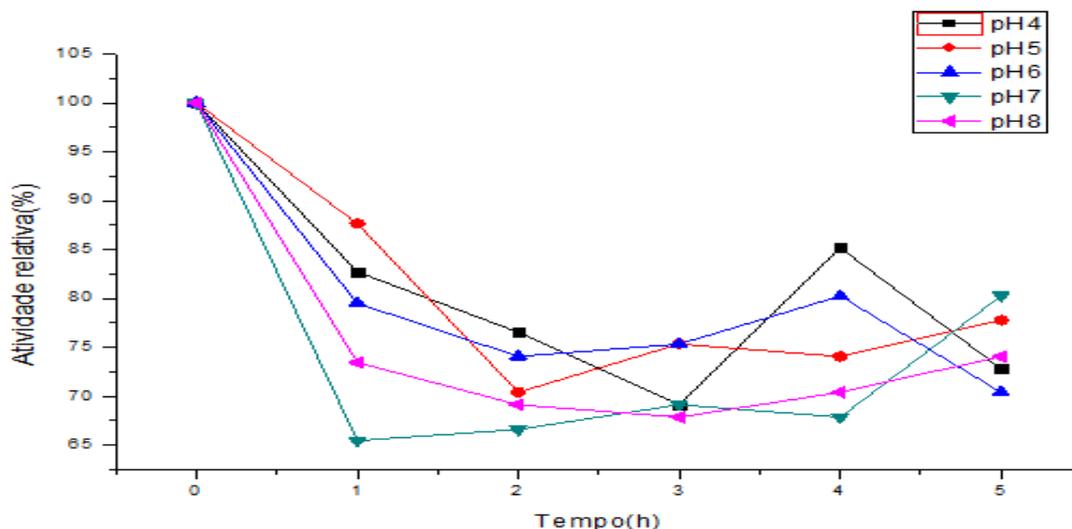


Figura 3.4 Perfil de estabilidade ao pH da endoglucanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de casca da amêndoa de cacau.



A estabilidade ao pH foi avaliada na faixa de 4 a 8 (**Figura 3.4**). Melhor estabilidade foi alcançada utilizando valores de pH na faixa de acidez (pH 4 e 5), sendo a atividade enzimática mantida acima de 80% após 5 h de incubação a 50 °C. Em valores de pH 6, 7 e 8, foram mantidas cerca de 66, 68 e 71% da atividade enzimática, respectivamente, após o tempo máximo de incubação investigado. WANG et al. (2014), utilizando a endoglucanase do fungo *T. emersonii* apresentou como resultado de estabilidade uma atividade acima de 80% na faixa de pH entre 1 e 6, e acima de 60% entre 7 e 10. A endoglucanase do fungo *A. Níger B03* estudada por DOBREV e ZHEKOVA (2012) apresentou-se estável em pH 3 enquanto que em pH 7 ela foi completamente inibida. POL et al. (2012) analisando a enzima de *A. poniphilum* MS 20 observaram preservação da atividade acima de 80% na faixa de pH entre 4 e 6.

3.3.3 Efeito da presença de diferentes sais e compostos orgânicos

O efeito de diferentes íons metálicos, solventes e outros compostos sobre a atividade de endoglucanase está representado na **Tabela 3.1**. Dentre os sete íons metálicos investigados dois apresentaram efeitos positivos. O íon Co^{2+} foi a espécie que exerceu maior efeito, aumentado cerca de 67% da atividade. As espécies Cu^{2+} e Mg^{2+} aumentaram a atividade em cerca de 27, e 5%, respectivamente. A presença do íon Pb^{2+} modificou acentuadamente a atividade de endoglucanase, ao passo que a espécie comportou-se como maior inibidor. A presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} e Zn^{2+} reduziram a atividade. Alguns metais podem reagir reversivelmente com enzimas formando

complexos que são mais ativos. Segundo Scopes (1994), o sítio ativo de uma enzima possui grupos aminoácidos que podem reagir com compostos metálicos resultando em alteração da atividade catalítica. Alguns íons de metais pesados podem ocasionar a oxidação de grupos presentes na cadeia lateral dos aminoácidos resultando em uma diminuição drástica de atividade.

Resultados similares foram divulgados utilizando endoglucanase de *Aspergillus fumigatus* (BAGEWADI et al., 2015), onde os íons Co^{2+} e Mg^{2+} também atuaram como ativadores. BAI, et al. (2013) avaliaram a influencia de ions metálicos em endoglucanase de *Penicillium simplicissimum* H-11 e também verificaram o efeito ativador do Mg^{2+} . GHORI, et al. (2012) e POL, et al. (2012), observaram nas endoglucanases de *Aspergillus niger* NRRL 567 e *Penicillium pinophilum* MS20, respectivamente, o efeito ativador do Co^{2+} e Mg^{2+} . SAHA (2004) realizou a análise da enzima endoglucanase da *Mucor circinelloides*, os íons Co^{2+} e Mg^{2+} aparecem como ativadores juntamente com o Cu^{2+} e o Ca^{2+} . Apesar de estudos relatarem o efeito inibitório do íon Cu^{2+} em endoglucanases, o aumento da atividade na presença do íon neste estudo pode ser explicado pelo microrganismo secretor em questão, já que segundo TEJIRIAN (2010), os efeitos dos íons podem variar com o microrganismo.

Tabela 3.1 Atividade de endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos.

	Atividade Relativa (%)
CONTROLE	100
MgCl_2	105,14 ± 0,00
CuSO_4	127,97 ± 0,01
$\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	167,58 ± 0,07
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	70,23 ± 0,00
$\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	86,34 ± 0,00
Na_2CO_3	82,32 ± 0,02
MnSO_4	90,37 ± 0,00
EDTA	38,00 ± 0,01
TRITON X	55,46 ± 0,00
TROLOX	118,87 ± 0,00
SDS	106,48 ± 0,00

Quando os agentes quelantes se complexam com metais nos meios de reação, o sítio ativo da enzima está disponível para reagir com o substrato, o que representa o efeito positivo desses compostos nas atividades de celulasas. Em contrapartida, o efeito negativo dos agentes quelantes sobre a atividade enzimática sugere que as atividades enzimáticas dependem do íon inorgânico que foi seqüestrado (PEREIRA et al., 2017).

Dentre os compostos orgânicos investigados, Trolox comportou-se como um ativador aumentando a atividade catalítica em cerca de 18,87%. Este composto apresenta atividade antioxidante, o que sugeriu um efeito protetor para com as endoglucanases estudadas, evitando, possivelmente, a oxidação de grupos das enzimas e permitindo a manutenção de sua forma ativa. A presença de SDS também resultou em aumento de 6% da atividade catalítica. Por outro lado, Triton X e EDTA apresentaram efeito inibidor, resultando em diminuição de cerca de 55% e 38% respectivamente, da atividade enzimática.

Os íons metálicos podem ser associados a proteínas e também podem formar complexos com outras moléculas ligadas a enzimas que atuam como doadores de elétrons ou aceitantes como ácidos de Lewis ou como reguladores estruturais. Estes íons podem ativar ou inibir a atividade enzimática através da interação com amina ou grupo ácido carboxílico dos aminoácidos (PEREIRA et al., 2017).

3.3.4. Estabilidade a diferentes solventes

Tabela 3.2 Valores das atividades da endoglucanase frente a diferentes solventes

	Atividade Relativa (%)
CONTROLE	100
Metanol	87,73 ± 0,008
Acetona	98,70 ± 0,005
Éter etílico	99,76 ± 0,003
Diclorometano	105,42 ± 0,003
Hexano	101,18 ± 0,005

Observa-se que o diclorometano e o hexano se comportaram como ativadores da endoglucanase, aumentando a atividade da enzima em 5,42 e 1,18%, respectivamente.

O metanol apresentou um efeito moderado como agente ativador da atividade enzimática, seguido da acetona e éter etílico. A estabilidade de enzimas na presença de solventes orgânicos é uma característica extremamente importante, uma vez que a maioria das enzimas são facilmente desnaturadas e inativadas na presença dos mesmos. No entanto, se as enzimas forem naturalmente estáveis e apresentarem uma atividade significativa na presença de solventes, as mesmas se tornam substanciais para diversas aplicações industriais.

3.3.4 Estimativa dos parâmetros cinéticos

A **Figura 3.5** apresenta o perfil cinético, relacionando as concentrações de substrato com os valores de atividade da endoglucanase, o comportamento linear da enzima produzida por *P. roqueforti* em casca da amêndoa de cacau confirma tratar-se de uma enzima Michaeliana. Para a obtenção dos valores de K_M e $V_{Máx}$, foi gerado o gráfico da **Figura 3.6** a partir da equação da linha de tendência, onde os valores para K_M e $V_{máx}$, foram 1,17 mg/mL e 0,90 mg/mL/min, respectivamente.

Quanto menor o valor de K_M maior a afinidade do substrato pela enzima (SEGEL 1979). DOBREV e ZHEKOVA (2012), encontraram o valor de K_M 21,01 mg/ml para endoglucanase de *Aspergillus niger* b03. DAVE, SUDHIR e SUBRAMANIAN (2015) apresentaram para endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus* K_M no valor de 37 mg/ml. EKPERIGIN et al. (2007), apresentaram para o substrato carboximetilcelulose, valores de k_m de endoglucanases de *A. anitratus* e *Branhamella sp.*, 4,97 e 7,90 mg/ml, respectivamente. BAKARE et al. (2005) encontraram o valor de K_M de 3,6 mg/ml para endoglucanases de *Pseudomonas fluorescens*. O baixo valor do K_M encontrado para a endoglucanase no presente trabalho sugere uma alta afinidade da enzima ao substrato carboximetilcelulose, resultado superior ao encontrado na literatura para outras endoglucanases fúngicas.

Figura 3.5 Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática da endoglucanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES sobre o resíduo de casca de amêndoa de cacau.

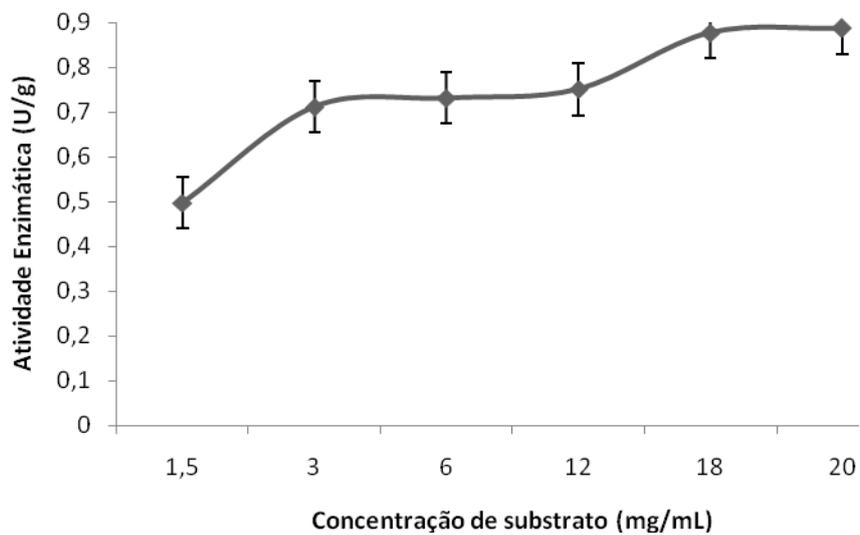
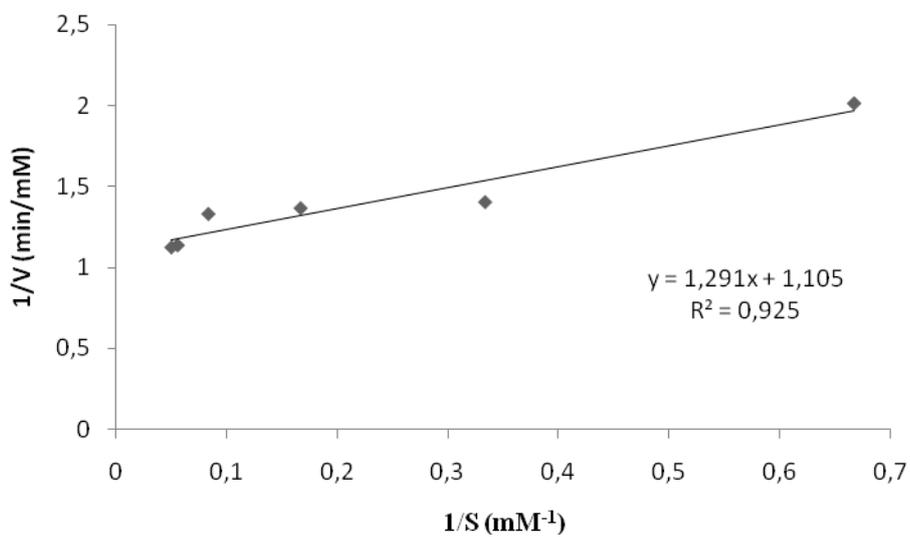


Figura 3.6 Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para estimação de K_M e $V_{Máx}$



3.4 CONCLUSÃO

Endoglucanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em casca da amêndoa de cacau, apresentou ótima estabilidade em uma faixa de pH e temperatura que são de extremo interesse para a indústria, que busca enzimas que resistam e atuem em condições economicamente e materialmente favoráveis. A ativação frente a muitos íons metálicos, detergentes e solventes também colabora para a utilização desta enzima em processos industriais e agrega valor a mesma.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual Do Sudoeste da Bahia (UESB) e Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

REFERÊNCIAS

ACHARYA S, CHAUDHARY A. Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. **J Sci Ind Res.** v. 70, n. 2, p. 142-148, 2011.

ACHARYA S, CHAUDHARY A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. **Braz Arch Biol Technol.** v. 55, n. 4, p. 497-503, 2012.

BAKARE MK, ADEWALE IO, AJAYI A, SHONUKAN OO. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **Afri J Biotechnol.** v. 4, n. 9, p. 898–904, 2005.

BAGEWADI, Z.K., NINNEKAR, H.Z. Production, purification and characterization of endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste. **International Journal of Biotechnology and Biomedical Sciences.** v. 1, n. 1, p. 25–32, 2015.

DAVE, B.R., SUDHIR, A.P., SUBRAMANIAN, A.R.B. Purification and properties of an endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Biotechnol rep (amst).** v. 6, p. 85–90, 2015.

DOBREV, G.T. E ZHEKOVA, B.Y. Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* b03. **Braz j microbiol.** v. 43, n. 1, p. 70–77, 2012.

EKPERIGIN, M.M. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp. **African Journal of Biotechnology.** v. 6, n. 1, p. 28-33, 2007.

GHORI, M.I., AHMED, S., MALANA, M.A., JAMIL, A. Kinetics of exoglucanase and endoglucanase produced by *Aspergillus niger* NRRL 567. **Afr. J. Biotechnol.** v. 11, n. 28, p. 7227–7231, 2012.

GHOSE TK. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl Chem.** v. 59, p. 257-68, 1987.

GRAMINHA, E.B.N., GONÇALVES, A.Z.L., PIROTA, R.D.P.B., BALSALOBRE, M.A.A., SILVA, R., GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.** v. 144, n. 1–2, p. 1-22, 2008.

HUANG S.; DENG G.; YANG Y.; WU Z.; WU L. Optimization of Endoglucanase Production from a Novel Bacterial Isolate, *Arthrobacter* sp. HPG166 and Characterization of Its Properties. **Braz. arch. biol. technol.** v.58, n.5, p. 692-701, 2015.

KAUR J., CHADHA B.S. , KUMAR B. A., SAINI H.S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology.** v. 98, n. 1, p. 74–81, 2007.

LINEWEAVER, H. AND BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of American Chemical Society.** v. 56, p. 658-666, 1934.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry.** v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PAYNE, C.M., KNOTT B.C., MAYES, H.B., HANSSON, H., HIMMEL, M.E., SANDGREN, M., STAHLBERG, J., BECKHAM, G.T. Fungal cellulases. **Chem. Rev.** v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PEREIRA J. C., GIESE E. C., MORETTI M. M. S., GOMES A. N. S., PERRONE O. M., BOSCOLO M., SILVA R., GOMES E. and MARTINS D. A. B. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellulolytic Enzymes Activities. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology.** v. 6, p. 139-164, 2017.

PODREPSEK, G.H., PRIMOZIC, M., KNEZ, Z., HABULIN, M. Immobilization of cellulase for industrial production. **Chem. Eng. Transact.** v. 27, p. 235–240, 2012.

POL, D., LAXMAN, R.S., RAO, M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from penicillium pinophilum MS 20. **Indian J. Biochem. Biophys.** v. 49, p. 189–194, 2012.

SALES A. N., SOUZA A. C., MOUTTA R. O., LEITÃO V. S. F., SCHWAN R. F. & DIAS D. R. Use of lignocellulose biomass for endoxylanase production by *Streptomyces termium*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology.** v. 47, n. 5, p. 505-512, 2017.

SAHA, B.C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochem.** v. 39, n. 12, p. 1871–1876, 2004.

SANTOS, T.C.; REIS, N. S; SILVA, T. P.; FRANCO M. Prickly Palm Cactus Husk as a Raw Material for Production of Ligninolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Sci. Biotechnol.** v. 25, n. 1, p. 205-211, 2016.

TEJIRIAN, A., XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 76, n. 23, p. 7673–7682, 2010.