



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

JOSÉ LUCAS DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ

**XILANASE DE *Penicillium roqueforti* ATCC 10110: PRODUÇÃO SOB
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, ESTUDO DE PROPRIEDADES
BIOQUÍMICAS E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE AGRORESÍDUOS**

**ILHÉUS-BA
FEVEREIRO DE 2017**

JOSÉ LUCAS DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ

**XILANASE DE *Penicillium roqueforti* ATCC 10110: PRODUÇÃO SOB
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, ESTUDO DE PROPRIEDADES
BIOQUÍMICAS E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE AGRORESÍDUOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC - como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Analítica Aplicada; Linha de Pesquisa: Análise de Alimentos e Bebidas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Janclei Pereira Coutinho

**ILHÉUS-BA
FEVEREIRO DE 2017**

F368 Ferraz, José Lucas de Almeida Antunes.
Xilanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110:
produção sob fermentação em estado sólido,
estudo
de propriedades bioquímicas e aplicação na
sacarifi-
cação de agrosíduos / José Lucas de Almeida
Antunes Ferraz. – Ilhéus, BA: UESC, 2017.
107 f. : il.

Orientador: Marcelo Franco.
Co-orientador: Janclei Pereira Coutinho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Química.
Inclui referências.

1. Enzimas. 2. Fermentação. 3. Hidrólise. 4. Plane-
jamento experimental. 5. Xilanases. I. Título.

CDD 572.7

JOSÉ LUCAS DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ


XILANASE DE *Penicillium roqueforti*: PRODUÇÃO SOB
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, ESTUDO DE
PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E APLICAÇÃO NA
SACARIFICAÇÃO DE AGRO-RESÍDUOS

Ilhéus-BA, Ilhéus, 21 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Marcelo Franco
Doutor em Química - UFRJ
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dra. Julieta Rangel de Oliveira (UESC)
Doutora em Ciências - USP
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dra. Ana Maria Queijeiro López (UFAL)
Doutora Bioquímica e Fitopatologia Molecular
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

A todos os responsáveis pelo que há de bom em mim. Principalmente, meu pai Silvino, minha mãe Liane e minha esposa Eli.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as condições necessárias, principalmente saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Silvino e Liane, pelo amor, ensinamentos e total apoio em todas as etapas ao longo de minha vida; a minha irmã, Bruna, meu cunhado, Bruno, e meus sobrinhos, Pedro e Maria Eduarda, pelos momentos especiais.

A Eli Aguiar, que foi muito mais que uma esposa, uma amiga companheira, por acreditar em mim e me ajudar a vencer os momentos de desânimo.

A todos os familiares, especialmente, minhas tias Lana, Léa, Lando e Sônia; aos novos familiares, Alga, Weliton, Lígia, Marcelo, Ariana, Holfman, Clara, Macel e Ísis; e ao meu primo Felipe, pelo companheirismo e palavras de encorajamento.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado. A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo, e a todos os docentes, técnicos e colegas do Programa de Pós-graduação em Química da UESC.

A meu orientador, Prof^o Dr. Marcelo Franco, pela ajuda, compreensão e confiança em mim depositados, e aos colegas do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat): Gleydison, Poly, Nadabe, Aila, Edvan, George, Maiara, Franciele e, principalmente, Lucas e Tatielle, pela amizade e companhia durante a realização desta jornada.

Aos professores: Dr. Raildo Mota de Jesus, Dr. Janclei Pereira Coutinho, Dra. Julieta Rangel de Oliveira, Dr. Márcio Luís Oliveira Ferreira, Dra. Elizama Aguiar de Oliveira, Dr. André Gustavo de Araujo Fernandes, Dr. Luiz Carlos Salay, Dra. Rosenira Serpa da Cruz, Dra. Rosilene Aparecida de Oliveira, Dr. Rodrigo Luis S. R. Santos, Dr. Francisco Heriberto Martinez Luzardo, Dr. Daniel de Castro Lima e Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, pela ajuda ao longo deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dra. Ana Maria Queijeiro López e Dra. Julieta Rangel de Oliveira, pela disponibilidade em participar e pelas contribuições acerca da dissertação.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

FERRAZ, J. L. A. A. **Xilanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110: produção sob fermentação em estado sólido, estudo de propriedades bioquímicas e aplicação na sacarificação de agroresíduos.** 107 p. Dissertação de Mestrado (Química) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2017.

RESUMO

As xilanases são um grupo de enzimas hidrolíticas de ampla ocorrência em micro-organismos como os fungos, bactérias e leveduras. A principal função das xilanases é catalisar a despolimerização de xilanas presentes em materiais lignocelulósicos para formar xilo-oligossacarídeos e xilose. 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 xilanases por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido empregando-se apenas resíduo de cajá (*Spondias mombim* L.) e água como alternativa aos meios de cultura comerciais. Para os testes de fermentação, foi avaliada também a utilização de resíduo de cajá submetido a um processo de extração com etanol puro. Os parâmetros temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação foram otimizados utilizando o planejamento experimental Box-Behnken. Utilizando o resíduo não processado com etanol foi alcançada uma máxima atividade de xilanase de 14,03 UI/g, ao passo que utilizando o resíduo processado foi alcançada uma máxima atividade de 6,24 UI/g. O extrato enzimático bruto (xilanase bruta) foi utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos e avaliado quanto ao efeito da temperatura, pH, adição de íons metálicos, compostos orgânicos, e efeito do congelamento sobre a atividade de xilanase. Os respectivos valores de K_m e $V_{Máx}$ encontrados foram 1,06 mg/mL e 16,23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. As xilanases apresentaram maior atividade em pH na faixa de 3-5 e temperatura de 60°C. Melhor estabilidade foi alcançada em pH na faixa de 3-5 e em temperaturas $\leq 60^\circ\text{C}$. A adição dos íons Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} e dos compostos Trolox e Triton X-100, melhorou a atividade de xilanase, ao passo que as espécies Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e SDS comportaram-se como inibidores. O congelamento a -20 ou 4°C manteve mais de 94% da atividade enzimática após 120 dias de armazenamento. Xilanase bruta foi utilizada visando a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, sabugo de milho e casca de arroz. Melhor rendimento de açúcares redutores (259,45 mg/g) foi alcançado quando utilizado bagaço de cana-de-açúcar como substrato após 4h de reação. A hidrólise de sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim resultou na produção de 180,22 mg/g, 137,70 mg/g e 128,48 mg/g, respectivamente. A adição de Mn^{2+} aumentou cerca de 86% o rendimento de açúcares durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Os parâmetros temperatura e carga de substrato foram otimizados utilizando o planejamento Doehlert. Máxima produção de açúcar (662,34 mg/g) foi alcançada mantendo a temperatura em 62,40°C e carga de substrato de 0,22%. O rendimento de açúcares foi significativamente alto quando comparado com estudos anteriores disponíveis na literatura, o que sugere a utilização de xilanase bruta adicionada de Mn^{2+} um processo alternativo e promissor para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras chave: Enzima. Hidrólise enzimática. Planejamento Experimental. Propriedades enzimáticas. Resíduos agro-industriais.

FERRAZ, J. L. A. A. **Xylanase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110: production under solid state fermentation, biochemical properties study and application in saccharification of agroresidues.** 107 p. Master's dissertation (Chemistry) – Santa Cruz State University, Ilhéus, Bahia, 2017.

ABSTRACT

Xylanases are a group of hydrolytic enzymes of wide occurrence in microorganisms such as fungi, bacteria and yeast. The main function of xylanases is to catalyze the depolymerization of xylans present in lignocellulosic materials to form xylooligosaccharides and xylose. In recent years, these enzymes have received increasing attention due to potential application in various industrial processes. In this study, it is described the xylanase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation using only yellow mombin (*Spondias mombim* L.) residue and water as an alternative to commercial culture media. For fermentation tests, it was also evaluated the use of yellow mombin residue subjected to an extraction process with pure ethanol. The parameters such as incubation temperature, initial moisture and fermentation time were optimized using Box-Behnken experimental design. Using the unprocessed residue it was achieved maximum xylanase activity of 14.03 IU/g whereas using the processed residue it was achieved a maximal activity of 6.24 IU/g. The crude enzymatic extract (crude xylanase) was used for the determination of kinetic parameters and evaluated for the effect of temperature, pH, addition of metal ions, organic compounds, and freezing effect on xylanase activity. The respective K_m and $V_{Máx}$ values were 1.06 mg/mL and 16.23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. Xylanases exhibited higher activity at pH in the range 3-5 and temperature of 60°C. Better stability was achieved in pH in the range of 3-5 and at temperatures $\leq 60^\circ\text{C}$. The addition of ions Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} and compounds Trolox and Triton X-100 improved xylanase activity, whereas the species Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and SDS behaved as inhibitors. Freezing the -20 or 4°C maintained more than 94% of the enzyme activity after 120 days of storage. Crude xylanase was used aiming the saccharification of sugarcane bagasse, peanut shells, corn cob and rice husk. Better yield of reducing sugars (259.45 mg/g) was achieved when using sugarcane bagasse as the substrate after 4 h of reaction. The hydrolysis of corn cob, rice husk and peanut shells resulted in the production of 180.22 mg/g, 137.70 mg/g and 128.48 mg/g, respectively. The addition of Mn^{2+} increased the yield of sugars by about 86% during saccharification of sugarcane bagasse. The parameters temperature and substrate load were optimized using Doehlert design. Maximum sugar yield (662.34 mg/g) was achieved by maintaining the temperature at 62.40°C and substrate load of 0.22%. The sugar yield was significantly high when compared to previous studies available in the literature suggesting the use of crude xylanase added Mn^{2+} an alternative and promising process for sugarcane bagasse saccharification

Keywords: Agro-industrial residues. Enzymatic properties. Enzymatic hydrolysis. Enzyme. Experimental Design.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Representação esquemática de parede celular vegetal..... 18
- Figura 1.2** - Estrutura primária de xilanas comumente encontradas na natureza. (a) homoxilana com ligações β -1,4; (b) homoxilana com ligações β -1,4 e β -1,3; (c) glucuronoxilana; (d) glucoronoarabinosilana e (e) arabinosilana 19
- Figura 1.3** - (a) Representação de estrutura de xilana mostrando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por enzimas xilanolíticas; (b) estrutura da xilobiose e sítio de ataque de β -xilosidases e (c) estrutura da xilopirranose20
- Figura 1.4** - Estrutura quaternária de xilanase de *Penicillium simplicissimum*. a) visão de cima; b) visão lateral21
- Figura 1.5** - Fermentação em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110 realizada em frascos Erlenmeyer utilizando resíduo de cajá e água como meio de cultivo.....25
- Figura 1.6** - Ilustrações do fungo *P. roqueforti*. (a) Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri; (b) aspecto da parte inferior das colônias em cultura controle em placa de Petri; (c) imagem de colônias sob microscopia óptica de 4x; (d) imagem de conidióforo e conídios corados com solução de algodão azul de lactofenol sob microscopia óptica de 40x29
- Figura 1.7** - Frutos e endocarpos da cajazeira31
- Figura 2.1** - Resíduos de cajá utilizados como substratos na FES para produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110. (a) resíduo seco (RC) e (b) submetido a extração com etanol e seco (RCE).....51
- Figura 2.2** - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação (T), umidade inicial (UD) e tempo de fermentação (t) no modelo ajustado para produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando RC (T*UD: interação entre os termos lineares T e UD; T*t: interação entre os termos lineares T e t; UD*t: interação entre os termos lineares UD e t)57
- Figura 2.3** - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação (T), umidade inicial (UD) e tempo de fermentação (t) no modelo ajustado para a produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando RCE (T*UD: interação entre os termos lineares T e UD; T*t: interação entre os termos lineares T e t; UD*t: interação entre os termos lineares UD e t).....58
- Figura 2.4** - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RC.....60
- Figura 2.5** - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RCE.....60

Figura 2.6 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y_{RC} representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de xilanase.....62

Figura 2.7 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y_{RCE} representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de xilanase.....63

Figura 3.1 - (a) Atividade de xilanase obtida em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 60 °C foi tomada como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). (b) Perfil de termoestabilidade de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0 h foi tomada como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....78

Figura 3.2 - (a) Atividade de xilanase obtida em diferentes pH (a mais alta atividade obtida em pH 3 foi tomada como 100%; condições de reação: temperatura: 50 °C, tempo 10 min). (b) Perfil de estabilidade ao pH de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0 h em pH 3 foi tomada como 100%; condições de reação: temperatura: 50 °C; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.80

Figura 3.3 - Efeito do congelamento do extrato enzimático bruto a -20°C e 4°C sobre atividade de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES quando cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0h foi tomada como 100%; o extrato enzimático bruto foi obtido utilizando tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8; condições de reação: temperatura: 50°C, pH: 4,8, tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.81

Figura 3.4 - (a) Efeito da concentração de substrato sobre a atividade de xilanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES sobre resíduo de cajá. (b) Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{Máx}$ (condições de reação: substrato utilizado: xilana *beechwood*; faixa de concentração: 1-20 mg/mL; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....85

Figura 4.1 - Sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim empregando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 6 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de

substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.97

Figura 4.2 - Efeito de Mn^{2+} sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar por xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 4 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.98

Figura 4.3 - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura (T) e carga de substrato (CS) no modelo ajustado para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 (T*CS: interação entre os termos lineares T e CS)..... 100

Figura 4.4 - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado para explicar a variabilidade dos resultados da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. 101

Figura 4.5 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y representando as interações entre as variáveis temperatura e carga de substrato, tendo-se como resposta a quantidade de açúcares redutores formados. 102

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1.1 - Alguns estudos de sacarificação de diferentes resíduos lignocelulósicos mediada por xilanases. | 24 |
| Tabela 1.2 - Estudos recentes envolvendo a aplicação da FES na produção de xilanases. | 27 |
| Tabela 1.3 - Alguns estudos envolvendo a aplicação da MSR para produção de xilanases microbianas. | 34 |
| Tabela 1.4 - Aplicação da MSR em estudos de hidrólise enzimática..... | 34 |
| Tabela 2.1 - Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de xilanase utilizando RC. | 54 |
| Tabela 2.2 - Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de xilanase utilizando RCE..... | 54 |
| Tabela 2.3 - Matriz do tipo Box-Behnken para a análise dos fatores temperatura (T, °C), umidade inicial (UD, %) e tempo de fermentação (t, h) sobre a atividade de xilanase (Y) produzida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em dois substratos: resíduos de cajá seco (RC) e seco e tratado com extração por etanol (RCE). | 56 |
| Tabela 2.4 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RC. | 58 |
| Tabela 2.5 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RCE..... | 58 |
| Tabela 3.1 - Atividade de xilanase de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato xilanolítico bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2 mM; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados entre parênteses indicam o desvio padrão de cada grupo de dados. | 83 |
| Tabela 4.1 - Variáveis e níveis do planejamento Doehlert para a otimização da sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 em fermentação em estado sólido sob resíduo de cajá..... | 95 |
| Tabela 4.2 - Matriz do tipo Doehlert para análise dos parâmetros temperatura (T, °C) e carga de substrato (CS, %) e otimização da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110. | 99 |
| Tabela 4.3 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos com o planejamento Doehlert..... | 101 |

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------|--|
| FES | Fermentação em estado sólido |
| FS | Fermentação submersa |
| MSR | Metodologia de superfície de resposta |
| RC | Resíduo de cajá |
| RCE | Resíduo de cajá tratado por extração com etanol |
| PDA | Ágar-dextrose-batata |
| BOD | Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| DNS | Ácido 3,5 dinitrossalicílico |
| UI | Unidade internacional de atividade enzimática |
| UI/g | Unidade internacional de atividade enzimática por grama de substrato |
| ANOVA | Análise de variância |
| R^2 | Coefficiente de determinação |
| R^2 -adj | Coefficiente de determinação ajustado |
| K_m | Constante de Michaelis |
| $V_{MÁX}$ | Valor máximo de velocidade inicial de reação catalisada por enzima |
| GL | Grau de liberdade |
| SQ | Soma dos quadrados |
| QM | Quadrado médio |
| F | Teste de Fisher |
| P | Probabilidade |
| UESC | Universidade Estadual de Santa Cruz |
| UESB | Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| T | Temperatura de incubação |
| UD | Umidade inicial |
| t | Tempo de fermentação |
| T*UD | Interação entre os termos lineares T e UD |
| T*t | Interação entre os termos lineares T e t |
| UD*t | Interação entre os termos lineares UD e t |

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| 1.1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.2 OBJETIVOS | 17 |
| 1.2.1 Objetivo geral | 17 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 1.3.1 Características gerais das xilanases | 18 |
| 1.3.2 Utilização de xilanases em sacarificação de resíduos lignocelulósicos | 22 |
| 1.3.3 Fermentação em estado sólido para produção de enzimas | 24 |
| 1.3.4 O fungo <i>Penicillium roqueforti</i> | 28 |
| 1.3.5 Aspectos gerais do cajá | 30 |
| 1.3.6 Técnicas de otimização multivariada para produção de enzimas | 32 |
| 1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 36 |
| 1.5 REFERÊNCIAS | 37 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Resíduo de cajá como matéria-prima de baixo custo para produção de xilanase por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 em fermentação em estado sólido | 48 |
|--|----|

CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 utilizando um resíduo agro-industrial como substrato | 72 |
|--|----|

CAPÍTULO 4

| | |
|---|----|
| Sacarificação de agrosresíduos utilizando xilanase bruta produzida por <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 | 90 |
|---|----|

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial de enzimas tem crescido cada vez mais. De acordo a BCC Research (2014), o mercado global de enzimas industriais aumentou de aproximadamente US\$ 4,5 bilhões em 2012, para cerca de US\$ 4,8 bilhões em 2013, sendo esperado um alcance de US\$ 7,1 bilhões para 2018.

Dentre as enzimas que participam do grande volume de vendas no mercado destacam-se as xilanases, que junto com as celulases e pectinases contribuem para cerca de 20% do mercado mundial de enzimas. As xilanases são responsáveis por catalisar a hidrólise de xilanas, principal componente da hemicelulose, para formar xilo-oligossacarídeos e xilose. Devido a esta propriedade, estas enzimas têm apresentado potencial para aplicação em diversos setores industriais, tais como manufatura de polpa e papel, alimentação animal, alimentação humana, bem como na conversão de resíduos lignocelulósicos em compostos químicos de valor agregado (Ang et al., 2013).

Crescente interesse tem surgido no emprego de xilanases em processos de hidrólise de resíduos agro-industriais para produção de açúcares fermentáveis que podem ser convertidos em biocombustíveis (Kumar et al., 2012; Chapla et al., 2010; Kocabas et al., 2015). Esses resíduos normalmente possuem alta concentração de hemicelulose que pode ser hidrolisada a açúcares via catálise enzimática utilizando xilanases.

A sacarificação enzimática de agrosresíduos oferece diversas vantagens quando comparada aos métodos químicos tradicionais (hidrólise térmica, ácida, alcalina), podendo-se destacar a alta especificidade, condições de reação mais suave, alto rendimento e menor formação de produtos indesejáveis (Sadaf e Khare, 2014; Chapla et al., 2010). Por outro lado, os altos custos e os baixos rendimentos envolvidos na produção de xilanases tem limitado seu uso, principalmente para sacarificação de agrosresíduos, tornando necessário o desenvolvimento de novos métodos de produção de enzimas que utilizem materiais de menor custo e forneçam melhores rendimentos (Kamble e Jadhav, 2012).

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados empregando a fermentação em estado sólido (FES) como processo de produção de xilanases

(Kaushik et al., 2014; Pirota et al., 2013; Adhyaru et al., 2016; Mander et al., 2014). Esta técnica tem-se mostrado bastante promissora, sendo capaz de fornecer uma alta produtividade, concentrações mais elevadas e maior estabilidade do produto final. Além disso, torna-se atrativa do ponto de vista econômico e ambiental por ser uma ferramenta que possibilita a utilização de resíduos agro-industriais como matéria prima de baixo custo (Kiran et al., 2014).

A FES pode ser governada por uma grande quantidade de fatores que podem ser considerados críticos para a viabilidade técnica e econômica do processo. Alguns dos fatores importantes que afetam o processo da fermentação incluem a natureza do meio de cultivo, o tipo de micro-organismo e as condições físico-químicas do processo (Thomas et al., 2013).

A produção de xilanase por FES pode ser mais eficiente utilizando-se fungos filamentosos (Polizeli et al., 2005). Os fungos do gênero *Penicillium* têm sido caracterizados como bons produtores de enzimas, sendo que a maioria das espécies constitui uma rica fonte de enzimas xilanolíticas (Knob e Carmona, 2010). Das espécies desse gênero, o *Penicillium roqueforti* tem sido aplicado em biotecnologia e apresentando diversas características favoráveis à fermentação, como, por exemplo, bom crescimento em baixo valores de pH e capacidade de utilizar uma variedade de compostos químicos como substrato, incluindo pentoses e hexoses (Mioso et al., 2014).

A utilização de meios de culturas de baixo custo torna-se essencial para o desenvolvimento de um bioprocesso viável para produção de enzimas microbianas. Neste sentido, os resíduos provenientes da agroindústria são considerados potencialmente úteis, visto que consistem de polissacarídeos e nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano e síntese enzimática (Santos et al., 2012).

Na agricultura brasileira, muitas culturas são consideradas geradoras de resíduos. Dentre estas, pode-se incluir o cajá, que, apesar de ser um fruto de produção espontânea, tem apresentado expressivo aumento da sua participação em diversos setores comerciais e regiões do país (Cavalcante et al., 2009). Na região sul da Bahia, a polpa de cajá é a que possui maior demanda entre as polpas de frutas comercializadas, ressaltando o crescimento no consumo deste fruto e dos seus subprodutos (Santos-Serejo et al., 2009). Estima-se que o processamento do cajá produza em torno de 40% de seu peso de resíduos, os quais não possuem

nenhum fim específico, sendo, na maioria dos casos, incinerados ou descartados na natureza (Cavalcante et al., 2009; Santos-Serejo et al., 2009).

Neste sentido, propor a utilização do resíduo de cajá como substrato para produção de xilanases por micro-organismos pode evidenciar este material como um meio de cultura alternativo, abundante e de baixo custo. Além disso, propor o estudo bioquímico das xilanases produzidas torna-se uma tarefa importante não só do ponto de vista científico, mas, também, do ponto vista técnico, devido à possibilidade de revelação de potenciais catalisadores a serem aplicados em processos catalíticos específicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar um bioprocesso em escala laboratorial para obtenção de xilanase fúngica por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, estudar as propriedades bioquímicas destas enzimas e aplicá-las na sacarificação de resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 como agente fermentador e resíduo de cajá como meio de cultura para produção de xilanases por fermentação em estado sólido;
- Avaliar a utilização de resíduo de cajá pré-tratado por extração com etanol como um substrato para produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110;
- Verificar os parâmetros de fermentação: temperatura de incubação, umidade inicial e tempo sobre a produção de xilanases e determinar as condições que levam a maximização da produção enzimática;
- Caracterizar as propriedades cinéticas e físico-químicas das xilanases obtidas.
- Avaliar o potencial de utilização do extrato enzimático bruto rico em xilanase obtido após o processo fermentativo, visando à sacarificação de biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim).

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Características gerais das xilanases

As xilanases são um conjunto de enzimas hidrolíticas de ampla ocorrência em organismos dos domínios Eucariota e Procariota, sendo os principais produtores os fungos, bactérias, leveduras, protozoários, algas marinhas, insetos, crustáceos e sementes. A principal função das xilanases é catalisar a degradação da xilana, reduzindo o grau de polimerização desse substrato (Manimaran et al., 2009; Irfan et al., 2014).

A xilana é um dos componentes majoritários da parede celular de plantas, sendo encontrada em grandes quantidades em madeira mole de gimnospermas (7 a 10% do conteúdo da parede celular), madeira dura de angiospermas (15 a 30%) e em plantas anuais (<30%). Dentro da estrutura da parede, é encontrada na fração da hemicelulose, que fica na interface entre a lignina e a celulose mantendo ligações covalentes e não covalentes que mantém a coesão das fibras e a integridade da parede celular (Figura 1.1).

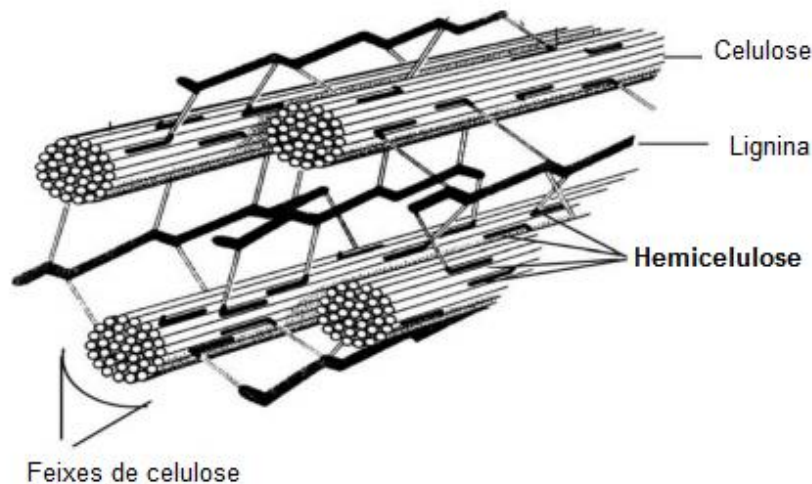


Figura 1.1 - Representação esquemática de parede celular vegetal (Yu et al., 2008).

Do ponto de vista estrutural, a xilana é caracterizada como um polissacarídeo que consiste de um esqueleto homopolimérico de unidades de D-xilopiranosil unidas por ligações β -1,4, e em alguns casos β -1,3, que pode conter ramificações de

cadeias curtas de resíduos de acetil, arabinofuranosil, glicuronosil, metil-glicuronosil, feruloil e/ou *p*-cumaroil. As ramificações e o grau de polimerização diferem nas estruturas de diferentes fontes. Normalmente, apresentam ramificações, no entanto, xilanas lineares não substituídas têm sido relatadas em algumas espécies de plantas e algas marinhas (Collins et al., 2005) (Figura 1.2).

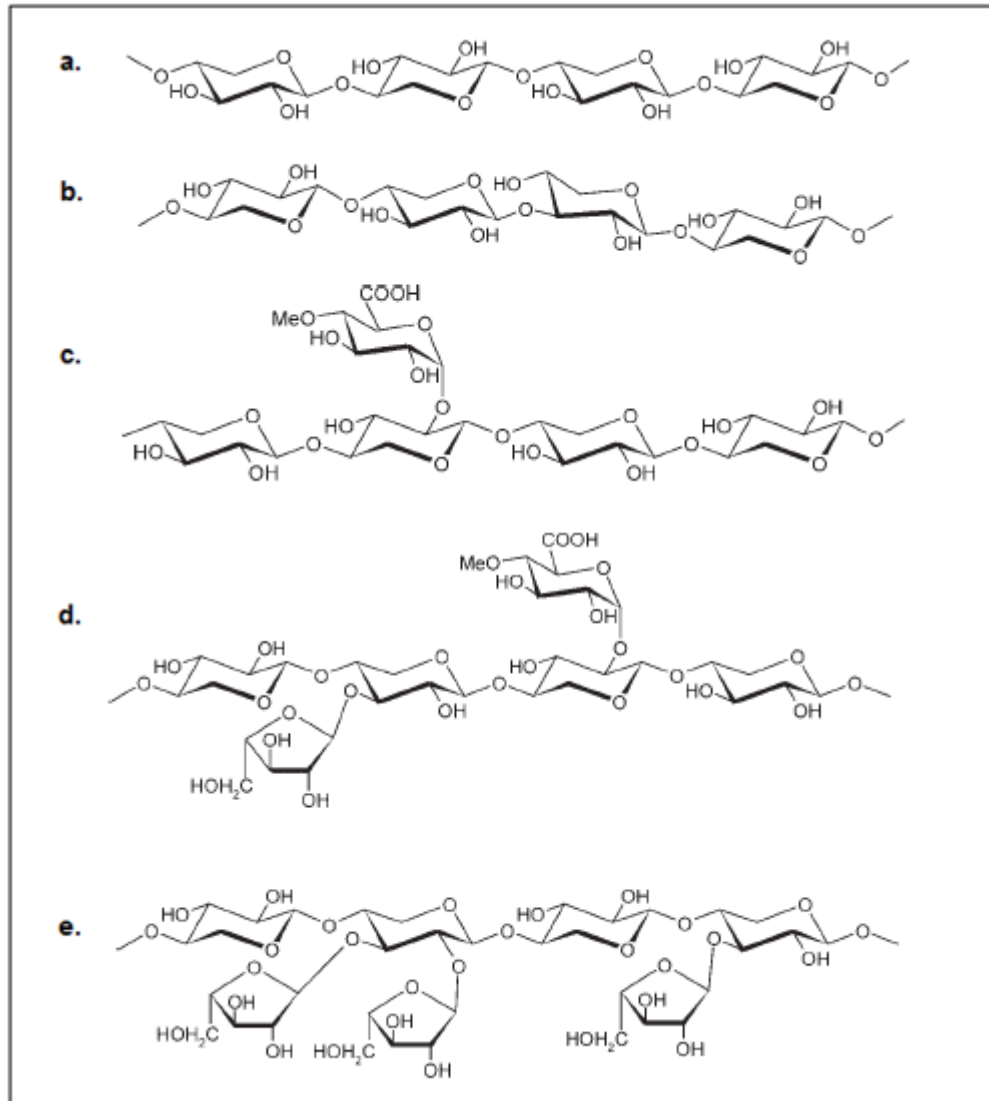


Figura 1.2 - Estrutura primária de xilanas comumente encontradas na natureza. **(a)** homoxilana com ligações β -1,4; **(b)** homoxilana com ligações β -1,4 e β -1,3; **(c)** glucuronoxilana; **(d)** glucuronoarabinoxilana e **(e)** arabinoxilana (Adaptado de Ebringerová, 2006).

As enzimas que constituem o sistema xilanolítico e que desempenham o principal papel na despolimerização da xilana são as endoxilanasas (β -1,4-D-xilana-xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) e as β -xilosidasas (β -D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37). Enzimas acessórias também são necessárias para a desramificação de

grupos laterais ligados à cadeia principal de xilanas substituídas, tais como acetil xilana esterase (EC 3.1.1.16), α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glicuronidase (EC 3.2.1.131), ácido *p*-cumárico esterase e ácido ferúlico esterase (Figura 1.3) (Mohana et al., 2008; Sonia et al., 2005; Subramaniyan e Prema, 2002).

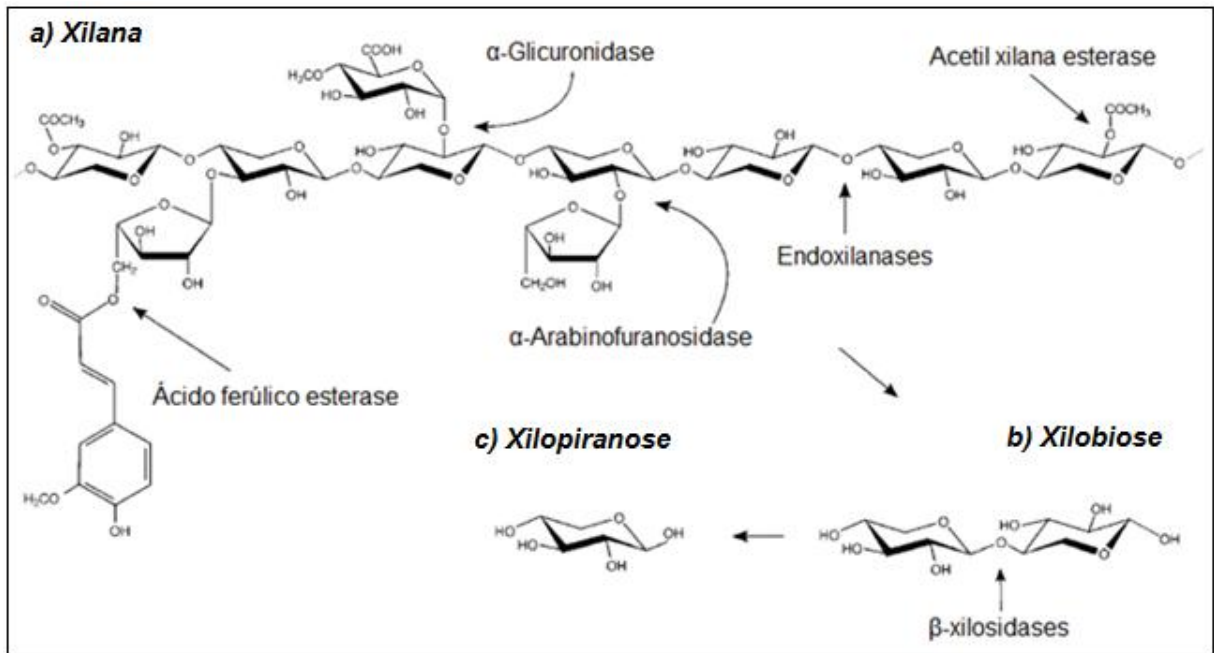


Figura 1.3 - (a) Representação de estrutura de xilana mostrando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por enzimas xilanólíticas; (b) estrutura da xilobiose e sítio de ataque de β -xilosidases e (c) estrutura da xilopiranosose (Adaptado de Pastor et al., 2007).

As endoxilanasases e as β -xilosidases atuam na cadeia principal da xilana. As endoxilanasases clivam as ligações glicosídicas interiores provocando uma diminuição do grau de polimerização e formando oligômeros de β -D-xilopiranosil, podendo formar também mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil. Essa clivagem ocorre de forma não aleatória, no entanto, o local de ataque enzimático depende das características estruturais da molécula do substrato, por exemplo, a presença de substituinte, o grau de ramificação e o comprimento da cadeia. Já as β -xilosidases atuam clivando as ligações terminais não redutores de pequenos xilo-oligossacarídeos e xilobiose liberando monômeros de β -D-xilopiranosil (Girio et al., 2010) (Figura 1.3).

As xilanases podem ainda ser classificadas de acordo com seu peso molecular e ponto isoelétrico (Wong et al., 1988), e com base na estrutura primária do domínio catalítico (Henrissat, 1991). A primeira propõe a classificação em dois grupos: um grupo de baixo peso molecular (<30KDa) e ponto isoelétrico básico, e

um segundo grupo de alto peso molecular (>30KDa) e ponto isoelétrico ácido. No entanto, existe um número significativo de xilanases que apresentam propriedades intermediárias e que não se adequam a essa classificação. Já o sistema de classificação baseado no domínio catalítico é considerado mais completo e, por isso, tem-se tornado o padrão para a classificação dessas enzimas, incluindo-as no grupo das glicosídeo hidrolases (EC 3.2.1.x) junto com outras hidrolases.

As enzimas do grupo das glicosídeo hidrolases são ainda subdivididas em famílias de acordo a similaridade na sequência de aminoácidos. A maioria das famílias compreende enzimas com mesma especificidade ao substrato, mas algumas famílias são também poli-específicas e incluem enzimas ativas em diferentes substratos. As xilanases são principalmente distribuídas em duas famílias: GH10 e GH11, que incluem enzimas de alto peso molecular/baixo ponto isoelétrico e baixo peso molecular/alto ponto isoelétrico, respectivamente, mas incluem também muitas outras xilanases com propriedades físico-químicas amplamente diferentes. Enzimas com atividade de xilanase estão também distribuídas nas famílias GH 5, 7, 8 e 43 (Dodd e Cann, 2009; Pastor et al., 2007).

A Figura 1.4 apresenta a estrutura quaternária de uma xilanase produzida por *Penicillium simplicissimum*, sendo indicada por Schmidt e colaboradores (1998) como pertencente à família GH10. O sítio ativo foi localizado em uma fenda no centro da enzima, sendo composto por resíduos catalíticos de glutamato. Maior atividade foi alcançada em pH relativamente baixo (pH 5,6) e temperatura de 67°C, indicando que mudanças nos níveis destes parâmetros podem influenciar na atividade catalítica de xilanases.

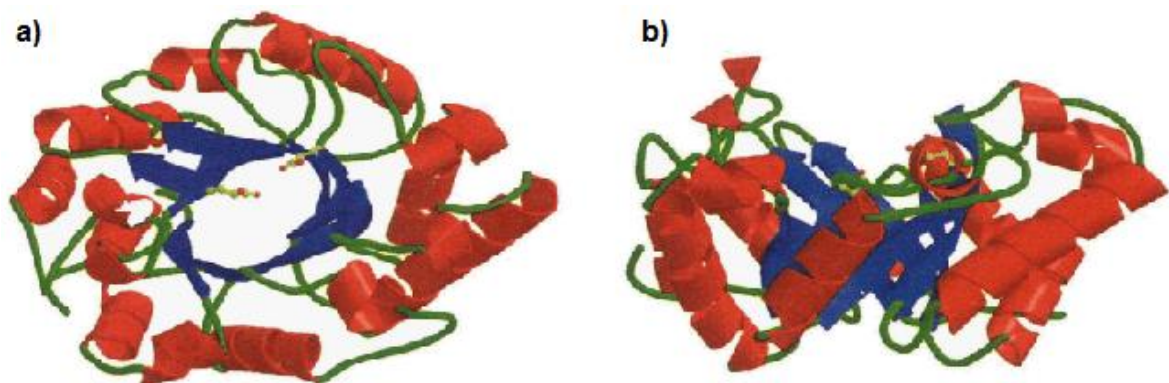


Figura 1.4 - Estrutura quaternária de uma xilanase produzida por *Penicillium simplicissimum*. **a)** Vista superior; **b)** vista lateral (Adaptado de Schmidt et al., 1998).

O interesse na obtenção de xilanases está relacionado às diversas possibilidades de aplicação e ao potencial biotecnológico em diversos processos industriais. Dentre essas aplicações podem-se destacar a indústria de manufatura de polpa e papel (branqueamento de polpa), indústria de alimentos e bebidas (clarificação de sucos, panificação, fabricação de vinhos, extração de café, óleos de plantas e amido), indústria farmacêutica (produção de xilooligossacarídeos com efeitos prebióticos), alimentação animal (melhoramento do valor nutricional de silagem, grama verde), bem como em outros setores biocatalíticos como biorremediação (tratamento de alguns resíduos industriais, agrícolas e municipais) e conversão de materiais lignocelulósicos em matérias-primas e combustíveis (bioetanol) (Goluguri et al., 2012; Bakri et al., 2008; Deutschmann e Dekker, 2012; Kamble e Jadhav, 2012; Collins et al., 2005; Subramaniyan e Prema, 2002).

Embora existam muitos organismos produtores de xilanase, os micro-organismos têm sido apontados como os preferenciais para a obtenção dessas enzimas devido a sua disponibilidade, estabilidade estrutural e fácil manipulação genética. As bactérias, leveduras e fungos filamentosos vem sendo amplamente estudados e indicados como potenciais produtores de enzimas xilanolíticas. Dentre os fungos, espécies do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* são consideradas excelentes fontes de enzimas para biodegradação de xilanas (Irfan et al., 2016; Knob e Carmona, 2010; Li et al., 2007).

Xilanases de micro-organismos podem ser obtidas utilizando as técnicas de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). Comercialmente, cerca de 80 a 90% de toda xilanase produzida são obtidas por FS. No entanto, a FES vem sendo amplamente investigada e sugerida como uma alternativa para redução de custos do processo de produção, além disso, é particularmente vantajosa para produção de enzimas por fungos filamentosos, uma vez que simula o *habitat* natural desses micro-organismos (Ang et al., 2013; Polizeli et al., 2005; Holker e Lenz, 2005).

1.3.2 Utilização de xilanases em sacarificação de resíduos lignocelulósicos

Nos últimos anos, diante da escassez de energia e dos problemas ambientais relacionados à utilização exacerbada de combustíveis fósseis, especial atenção tem sido dada aos biocombustíveis, principalmente o etanol de segunda geração, visto

que o mesmo é produzido a partir de biomassa lignocelulósica residual, requer um menor ciclo de produção e está relacionado a uma menor emissão de gases do efeito estufa (Goldenberg, 2007; Pensupa et al., 2013)

A conversão de resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentáveis é considerada uma etapa crítica para a produção de bioetanol (Yu et al., 2013). Entre as tecnologias disponíveis pode-se destacar a hidrólise enzimática. Este método oferece diversas vantagens, como alta especificidade, condições de reação mais suave, alto rendimento, menor gasto de energia e menor formação de produtos indesejáveis (Chapla et al., 2010; Sadaf e Khare, 2014; Vicuna et al., 1995).

A sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos requer a participação de celulasas, hemicelulasas e outras glicosil hidrolases (Rodríguez-Zúñiga et al., 2013; Pensupa et al., 2013). As xilanases tornam-se particularmente importantes devido a função de catalisar a despolimerização de xilanas, principal componente da hemicelulose a qual representa cerca de 15 a 30% da biomassa vegetal para formar açúcares fermentáveis, tal como xilose (Ebringerová et al., 2005). Além disso, as xilanases também atuam na desestruturação do entrelaçamento entre a hemicelulose e a celulose que existe na parede celular vegetal, facilitando, dessa forma, a atuação de celulasas sobre a fração celulósica dos resíduos (Farinas, 2011).

A presença da xilana em biomassa lignocelulódica também ocorre como complexo lignina-xilana. Este fato contribui para tornar a biomassa recalcitrante à hidrólise enzimática (Chapla et al., 2012). Além disso, a adsorção não produtiva das enzimas à lignina também prejudica a hidrólise (Ko et al., 2015). Dessa forma, frequentemente, etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico tem sido apontadas como necessárias para o rompimento da barreira recalcitrante promovida pela presença de lignina e promover maior porosidade do material, possibilitando, assim, uma maior eficiência de sacarificação (Mosier et al., 2005; Wong et al., 1988). Pré-tratamento com ácidos ou bases diluídos, amônia aquosa, água quente líquida e explosão de vapor são exemplos de processos de pré-tratamento que podem ser utilizados em agrosresíduos (Ibbett et al., 2011; Kim et al., 2003). Entretanto, a utilização destas estratégias vem sendo bastante discutida, principalmente, devido aos consideráveis custos que acrescentam ao processo podendo torná-lo desvantajoso. A Tabela 1.1 apresenta diferentes estudos

envolvendo a utilização de xilanases visando a sacarificação de resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1.1 - Alguns estudos de sacarificação de diferentes resíduos lignocelulósicos mediada por xilanases.

| Micro-organismo | Substrato | Pré-tratamento | Açúcares redutores (mg/g) | Referência |
|---------------------------------|-----------------|---|---------------------------|----------------------|
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Sabugo de milho | Amônia (15%), 60°C, 12h | 553,94 | Zhang e Sang, 2015 |
| <i>Penicillium</i> sp. | Palha de trigo | - | 49,9 | Murthy e Naidu, 2012 |
| | Palha de arroz | | 42,5 | |
| <i>Burkholderia</i> sp. | Farelo de trigo | - | 5,5 | Mohana et al., 2008 |
| <i>Scytalidium thermophilum</i> | Sabugo de milho | - | 17,4 | Kocabas et al., 2015 |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Sabugo de milho | NaOH 2N, 30°C, 20h/Tratamento térmico a 121°C por 90 min. | 63,40 | Damaso et al., 2004 |
| <i>Bacillus circulans</i> | Casca de soja | - | 29,5 | Heck et al., 2006 |
| | Fibra de soja | | 21,5 | |
| | Palha de arroz | | 14,0 | |
| | Pele de uva | | 13,0 | |
| | Bagaço de cana | | 4,8 | |
| <i>Aspergillus foetidus</i> | Palha de trigo | Amônia (15%), 121°C, 12h | 193,86 | Chapla et al., 2010 |
| | Palha de arroz | | | |
| | Sabugo e milho | | | |
| <i>Bacillus altitudinis</i> | Palha de sorgo | Peróxido de hidrogênio (3%) | 34,94 | Adhyaru et al., 2014 |

1.3.3 Fermentação em estado sólido para produção de enzimas

A FES pode ser definida como um bioprocesso 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 na ausência ou quase 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 (Figura 1.4) (Holker et al., 2004; Pandey, 2003).



Figura 1.5 - Fermentação em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110 realizada em frascos Erlenmeyer utilizando resíduo de cajá e água como meio de cultivo.

Nas últimas décadas, a FES tem atraído crescente atenção para a produção de enzimas e vem sendo bastante apontada como uma alternativa à 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 (Couto e Sanroman, 2006; Wang et al., 2008; Mitchell et al., 2000).

Outro aspecto que favorece o emprego da FES é a possibilidade de utilização de resíduos de origem agro-industrial como matéria prima barata, os quais são muitas vezes descartados na natureza causando poluição. 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).

Existem vários fatores que podem ser considerados críticos para a viabilidade técnica e econômica da FES. Alguns dos fatores importantes que afetam o processo da fermentação incluem a natureza do substrato (principalmente a capacidade de retenção de água, ou atividade de água, tamanho de partícula), o tipo de micro-organismo e as condições físico-químicas do processo (temperatura, pH, taxa de difusão de oxigênio e tempo de fermentação) (Thomas et al., 2013; Pandey et al., 1999).

Diferentes enzimas podem ser produzidas por FES, tais como celulase, β -glicosidase, amilase, exoglucanase, endoglucanase, L-asparaginase, lipase, invertase, β -mananase, laccase, quitosanase, fitase, protease, tannase e, principalmente, xilanase e xylosidase (Thomas et al., 2013).

A produção de xilanase por FES vem sendo amplamente estudada. Alguns dos principais focos são a avaliação de diferentes micro-organismos, substratos sólidos e condições de cultivo. A Tabela 1.2 contém alguns trabalhos voltados para a aplicação da FES na síntese de xilanas envolvendo diferentes micro-organismos e substratos.

Os micro-organismos utilizados em processos de FES são os fungos e as bactérias. Os gêneros de fungos mais empregados são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rizhopus*, ao passo que o gênero *Bacillus* é o mais representativo das bactérias. Em geral, os fungos são considerados os mais adaptados para esse tipo de técnica. Essa característica é atribuída principalmente pela capacidade de crescerem em resíduos sólidos e penetrarem nos espaços entre partículas dos substratos. As hifas fúngicas também podem penetrar em algumas matrizes de estruturas sólidas (El-Bakry et al., 2015).

Os fungos tornam-se particularmente interessantes para a produção de xilanas. A capacidade desses micro-organismos de excretar enzimas degradantes de xilanas e enzimas auxiliares torna-os atraentes do ponto de vista industrial devido a eliminação da etapa de ruptura celular para recuperação de enzimas. Além disso, os níveis de xilanase a partir de culturas fúngicas são geralmente muito maiores do que aqueles a partir de bactérias (Bajpai et al., 2009; Polizeli et al., 2005).

Tabela 1.2 - Estudos recentes envolvendo a aplicação da FES na produção de xilanases.

| Micro-organismo | Substrato | Condições de cultivo | Referência |
|--|---|--|-----------------------------|
| <i>Penicillium</i> sp. | Subprodutos de café | Umidade 50%; pH 5; 30°C, 5 dias | Murthy e Naidu, 2012 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Casca de arroz | 30° C; 6 dias | Kapilan e Arasaratnam, 2011 |
| <i>Aspergillus lentulus</i> | Farelo e palha de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar | 30°C; 5% de inóculo | Kaushik et al., 2014 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Farelo de trigo e torta de soja | Umidade 70%; 40°C; 6 dias | Pal e Khanum, 2010 |
| <i>Penicillium echinulatum</i> | Capim elefante pré-tratado por explosão a vapor | 28-30°C; 1 x 10 ⁶ esporos/g de matéria seca | Scholl et al., 2015 |
| <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> | Bagaço de maçã | 35°C; 3 dias | Walia et al., 2015 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Pó de palha de milho e farelo de trigo | Umidade 74%; pH 4,5; 11,6% de inóculo | Zhang e Sang, 2015 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | Sabugo de milho e farelo de trigo | Umidade 1:4; pH 6,7; 1% de inóculo | Chaturvedi et al., 2015 |
| <i>Sporotrichum thermophile</i> | Torta de semente de jatrofa | pH 9,5; 35 °C; 6% de inóculo | Sadaf e Khare, 2014 |
| <i>Mucor indicus</i> , <i>Mucor hiemalis</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> | Farelo de trigo | Umidade 49,8-71,8%; 40-43,4°C; 1000 esporos/g de farelo seco | Behnam et al., 2016 |
| <i>Acidothermus cellulolyticus</i> | Gramíneas | 55°C | Rezaei et al., 2011 |
| Co-cultura de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> | Casca de soja e farelo de trigo | Umidade 70%; pH 5; 30°C | Brijwani et al., 2010 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Óleo de tronco de palma | Umidade 80%; pH 5; 1 x 10 ⁸ esporos/ g | Ang et al., 2013 |
| <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus wentii</i> e <i>Penicillium verrucosum</i> | Tortas de babaçu, mamona, canola e girassol | Umidade 70%; pH 5,8; 30°C; 1 x 10 ⁷ esporos/g | Castro et al., 2011 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Bagaço de azeitona | Umidade 75%; 30°C | Leite et al., 2016 |
| <i>Trichoderma viride</i> | Bagaço de cana de açúcar | pH 4,5; 30°C; 10% de inóculo | Irfan et al., 2014 |

Os principais resíduos utilizados em fermentação em estado sólido são de origem vegetal e animal proveniente da indústria de alimentos. Dentre os resíduos de origem animal destacam-se esterco de vaca, resíduo sólido de curturme, pena de galinha e farinha de peixe. Dentre os de origem vegetal destacam-se os resíduos de

arroz, trigo, soja, algodão, cascas e bagaços de vegetais e frutas e resíduo de grãos utilizados na fabricação de pães e bebidas fermentadas (El-Bakry et al., 2015). Nas pesquisas voltadas para aplicação da FES na produção de xilanase os resíduos mais investigados são os resíduos de trigo (farelo, palha), milho (sabugo, palha), cana-de-açúcar (bagaço) e soja (Tabela 1.2).

Para maximizar a produção de enzimas por FES é necessário determinar as condições ótimas de cultivo. Neste âmbito, as técnicas estatísticas de planejamento de experimentos têm sido utilizadas com bastante êxito, sendo a metodologia de superfície de resposta uma das preferenciais (Santos et al., 2016). Além das condições de cultivo, à utilização de cepas de micro-organismos adequadas e meios de cultura que induzam o crescimento e formação de enzimas tornam-se particularmente proeminentes (Vu et al., 2011).

1.3.4 O fungo *Penicillium roqueforti*

Penicillium é um gênero de fungos bem conhecido e de ocorrência nos mais diversos tipos de *habitat*, que incluem solos, vegetações, madeiras, sementes e vários produtos alimentícios. Sua principal função na natureza é a decomposição de matéria orgânica. Algumas espécies podem apresentar impactos negativos ao homem como, por exemplo, o comportamento oportunista de plantas causando doenças de pré e pós-colheita em diversas culturas alimentares. Entretanto, numerosas espécies apresentam um valor particular, sendo exploradas, principalmente, para a produção de alimentos (queijos, embutidos fermentados), fármacos (penicilina), bem como para a produção de enzimas (Frisvad e Samson 2004; Pitt, 1988; Chávez et al., 2006).

O gênero *Penicillium* é classificado cientificamente como pertencente ao filo Ascomycota, classe Eurotomyces, ordem Eurotiales e da família Trichocomaceae (Pitt, 2002). 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 nomes foram introduzidas ao gênero. Porém, alguns desses nomes 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 354

espécies aceitas para esse gênero, inclusive a espécie *P. roqueforti* (Visagie et al., 2014).

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, que são raramente Biverticillata, normalmente Terverticillata, e, ocasionalmente, Quaterverticillata (Figura 1.5) (Abbas e Dobson, 2011).

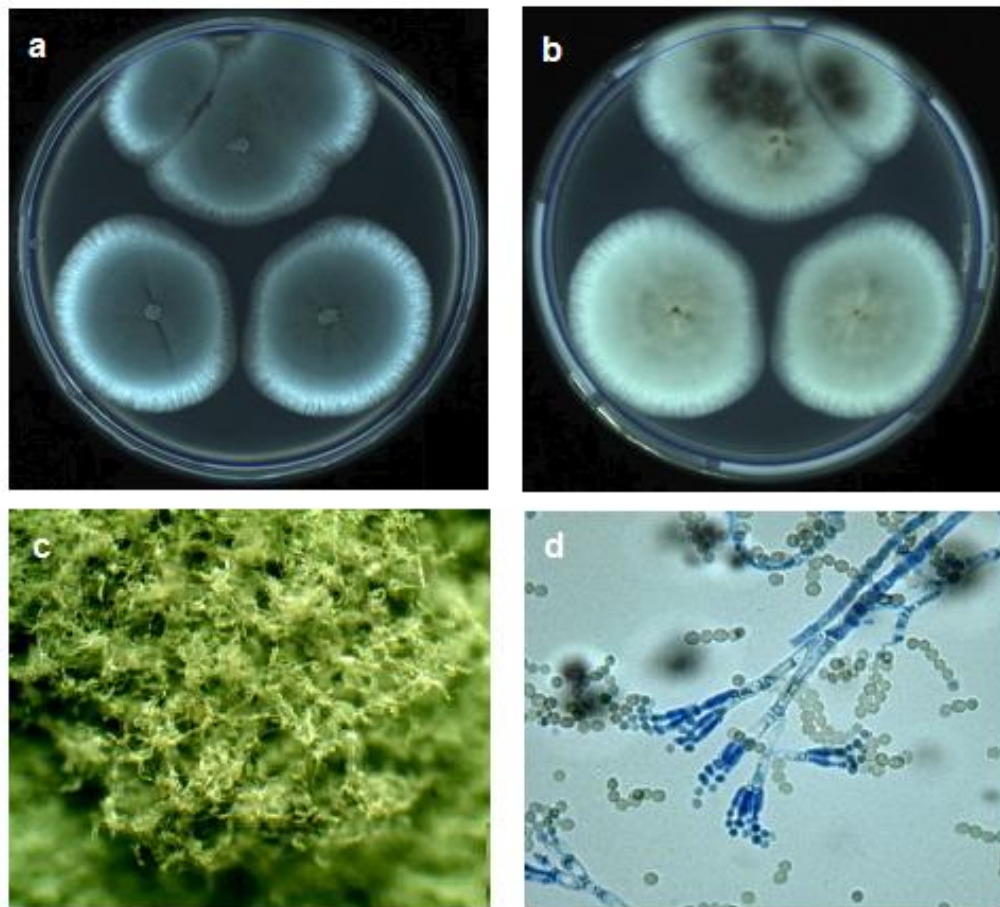


Figura 1.6 - Ilustrações do fungo *P. roqueforti*. **(a)** Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri; **(b)** aspecto da parte inferior das colônias em cultura controle em placa de Petri; **(c)** imagem de colônias sob microscopia óptica de 4x; **(d)** imagem de conidióforo e conídios corados com solução de algodão azul de lactofenol sob microscopia óptica de 40x (Adaptado de <http://atlas.microumftgm.ro/micologie/filamentosi/penroqueforti.php>).

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), ácidos orgânicos e ácidos fracos conservantes (Abbas e Dobson, 2011). Além dessas características, o conjunto de enzimas lipolíticas, proteolíticas, decarboxilase e deaminase, torna esse micro-organismo adequado para diversas aplicações biotecnológicas, que incluem a remoção de escamas de peixe, produção de lipídios de alta qualidade a partir de resíduos alimentares, elaboração de bebidas lácteas, preservação de produtos de carne, produção de enzimas por meio de processos de fermentação e maturação do queijo Roqueforti (Mioso *et al.*, 2014).

Em relação à produção de enzimas industriais, *P. roqueforti* é utilizado, principalmente, para obtenção de lipase, estando disponível comercialmente a lipase R “Amano”® obtida desse micro-organismo (produzida pela Amano Enzyme Inc., Japan) (Li e Zong, 2010). Já a produção de enzimas industriais por *P. roqueforti* sob fermentação em estado sólido ainda é pouco estudada. Neste âmbito, esse micro-organismo tem sido avaliado na produção de enzimas pectinolíticas (Peričin *et al.*, 2007; Fernandes, 2014), lipásicas (Rivera-Muñoz *et al.*, 1991) e celulásicas (Peričin *et al.*, 2008).

1.3.5 Aspectos gerais do cajá

Cajá é um fruto da cajazeira (*Spondias mombin* L.), uma espécie de árvore frondosa que pode ser encontrada em áreas tropicais da África, Ásia e América. O fruto é também conhecido como taperebá no Brasil, ciruela amarilla no México e Equador, jobo na América Central e hogplum ou yellow mombin na América do Norte (Tiburski *et al.*, 2011). Pertence a família Anacardiaceae e ao gênero *Spondias*, que também inclui outras espécies de frutíferas tropicais como a serigüeleira (*S. purpurea* L.), o umbuzeiro (*S. tuberosa* Arruda), a cajaraneira (*S. dulcis* Parkinson) e a umbu-cajazeira (*Spondias* sp.) (Lima *et al.*, 2011).

Caracterizado como uma drupa elipsoide achatada na base, o cajá possui de 3 a 4 cm de comprimento, casca fina e lisa de cor amarelo-alaranjado, polpa sucosa

e pouco espessa, também variando do amarelo ao alaranjado, suculenta e de sabor ácido-adocicado. O endocarpo, também chamado de caroço, é branco, lenhoso com fibras esponjosas, enrugado, alongado e contém de dois a cinco lóculos e zero a cinco sementes (Figura 1.6) (Souza et al., 2000; Sacramento e Souza, 2009).

No Brasil, as cajazeiras são encontradas isoladas ou agrupadas na Amazônia, Mata Atlântica e nas regiões Norte e Nordeste. Desenvolve-se bem em locais de clima úmido e subúmido, quente e temperado quente, resistindo a longos períodos de seca. Na Bahia, são encontradas principalmente em áreas de cultivo de cacau da região sul, entre os paralelos 14º e 16º, numa faixa de 100 km a partir do litoral (Sacramento e Souza, 2000). A maior concentração dá-se, portanto, nos municípios onde há exploração de cacau: Ilhéus, Uruçuca, Itabuna, Ibicaraí, Floresta Azul, Camacã, Ubatã, Pau Brasil, Ipiau, Itapé, Ubaitaba, Aurelino Leal, Coaraci Tancredo Neves, Santa Luzia, Jussari e São José da Vitória (Santos-Serejo et al., 2009).



Figura 1.7 - Frutos e endocarpos da cajazeira (Fonte: Sacramento e Barreto, 2012).

Nos últimos anos, o consumo de produtos comerciais de frutas regionais tem aumentado devido a sua acessibilidade, disponibilidade e fácil preparação (Assis et al., 2006). Neste contexto pode se destacar o cajá, que, apesar de ser um fruto de produção em agricultura familiar, tem registrado expressivo aumento na participação de diversos setores comerciais e regionais do país, principalmente pela possibilidade de consumo da fruta *in natura* ou processada na forma de polpa, sucos, sorvetes, doces, geleias e compotas. Além disso, possui uma excelente qualidade nutricional, sendo rico em vitaminas (A, B1, B2 e C), minerais (cálcio, potássio, ferro e fósforo) e

ainda tem uma alta concentração de carotenoides e taninos (Cavalcante et al., 2009; Vidigal et al., 2011). Devido à acidez do cajá, tem havido uma maior preferência no consumo de seus processados em comparação ao consumo *in natura*. Este fato tem direcionado a maior parte da produção para agroindústrias regionais (Santos-Serejo et al., 2009).

O processamento do cajá produz entre 60 e 80% de seu peso de polpa, gerando entre 20 e 40% de resíduos, que incluem a casca e o endocarpo (Moura et al., 2011), os quais não possuem um fim específico, sendo estimado como destino final a incineração e o descarte como lixo orgânico.

A utilização de resíduo de cajá como substrato na FES para produção de enzimas industriais tem sido muito pouco investigada. Apenas o trabalho de Ferreira e colaboradores (2011) foi encontrado, onde o resíduo de cajá foi utilizado como meio de cultura para produção de endoglucanase por *Aspergillus niger*. Como resultado, o estudo apontou a aplicação desse resíduo viável para a obtenção de endoglucanase.

1.3.6 Técnicas de otimização multivariada para produção de enzimas

Um importante assunto na síntese de enzimas e em catálise enzimática é o rendimento de produção. Visto que diversas variáveis podem governar o processo de fermentação, determinar os principais fatores que influenciam no processo, bem como encontrar as condições destes fatores que possam fornecer o melhor resultado, tornou-se um interesse comum a muitas indústrias e pesquisadores (Ghaffari-Moghaddam et al., 2014; Bas e Boyaci, 2007).

Um método tradicional utilizado para se alcançar as condições ótimas de cada variável é a otimização univariada, onde apenas um parâmetro é variado enquanto outros são mantidos em um nível constante (Lundstedt et al., 1998). No entanto, esta abordagem tem mostrado-se bastante laboriosa, demandando uma grande quantidade de experimentos e acarretando em um aumento de tempo e materiais, além de não descrever os efeitos de interação entre os parâmetros (Santos et al., 2013; Granato et al., 2010; Hanrahan e Lu, 2006).

Uma opção para superar os problemas apresentados pela otimização univariada é a utilização das técnicas de planejamento experimental, ou técnicas de planejamento fatorial, em combinação com a metodologia de superfície de resposta

(MSR). O termo 'planejamento de experimentos' refere-se a um conjunto específico de experimentos de uma matriz contendo diferentes combinações de níveis das variáveis a serem estudadas, ao passo que a MSR pode ser definida como uma coleção de ferramentas matemáticas e estatísticas úteis para a modelagem e análise de problemas. Em geral, a MSR integra as técnicas de planejamento experimental, sendo utilizada em situações quando uma resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis independentes e quando o objetivo é otimizar esta resposta (Bezerra et al., 2008; Myers e Montgomery, 2002)

Existem diversos modelos de planejamentos utilizados para etapa de triagem e identificação das variáveis de maior importância ou efeito sobre a resposta em questão e também planejamentos de segunda ordem que podem ser utilizados para otimização de variáveis. Os principais planejamentos utilizados em otimização de variáveis são: Box-Behnken, Doehlert, composto central e fatorial de três níveis (Pereira-Filho, 2015; Barros Neto et al., 2001; Ferreira, 2015). Dentre estes, os planejamentos Box-Behnken e Doehlert necessitam de igual número de experimentos, N , relacionadas ao número de variáveis em estudo, k ($N = 2^k + 2k + 1$ e $N = 2k^2 - 2k$, respectivamente), e têm sido considerados de alta eficiência devido à quantidade reduzida de experimentos necessários quando comparado aos planejamentos composto central e fatorial de três níveis ($N = 2^k + 2k + 1$ e $N = 3^k$, respectivamente) (Ferreira, 2015).

Após a realização dos experimentos, de acordo a um planejamento experimental seguido, torna-se necessário um tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial. Esse passo é seguido pela avaliação do ajustamento do modelo (considerando as respostas experimentais e os valores previstos pelo modelo), verificação da necessidade e possibilidade de realizar um deslocamento do domínio experimental para a direção da região ótima e, por fim, é possível obter os valores otimizados para cada variável estudada (Ghaffari-Moghaddam et al., 2014; Breikreitz et al., 2014).

No campo da produção de enzimas, a MSR tem sido extensivamente utilizada para otimizar as condições de cultura e composição do meio dos processos fermentativos empregados (Tabela 1.3). Ao passo que em hidrólise enzimática a principal utilização está voltada para a otimização dos parâmetros de reação, que incluem temperatura, concentração de substrato, carga enzimática, dentre outros (Tabela 1.4).

Tabela 1.3 - Alguns estudos envolvendo a aplicação da MSR para produção de xilanases microbianas.

| Tipo de planejamento experimental | Parâmetros otimizados | Referência |
|--|---|-------------------------------|
| Composto Central | Temperatura e umidade | Castro et al., 2015 |
| Box-Behnken | Nível de inóculo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH | Jatinder et al., 2006 |
| Composto Central | Farelo de soja, extrato de levedura e idade do inóculo | Rodríguez-Zúñiga et al., 2013 |
| Composto Central | Temperatura de cultivo, umidade e tempo de fermentação | Behnam et al., 2016 |
| Composto Central | Glicose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e peptona | Chaturvedi et al., 2015 |
| Box-Behnken | Tempo de incubação, temperatura e umidade | Garai e Kumar, 2013 |
| Composto central | pH, temperatura, umidade e tempo de incubação | Ghoshal et al., 2015 |
| Box-Behnken | Tempo de fermentação, tamanho do inóculo, quantidade de substrato e umidade inicial | Kar et al., 2013 |
| Box-Behnken | Extrato de levedura, triptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e CaCl_2 | Li et al., 2007 |
| Box-Behnken | pH inicial, umidade, concentração do efluente e tamanho do inóculo | Mohana et al., 2008 |
| Composto Central | Tempo de cultivo e concentração de meio basal | Park et al., 2002 |
| Box-Behnken | Tamanho do inóculo, glicerol e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Sonia et al., 2005 |
| Composto Central | Extrato de levedura, NH_4NO_3 , peptona, ureia, carboximetilcelulose, tween 20, CaCO_3 e MgSO_4 | Walia et al., 2015 |
| Box-Behnken | pH inicial, tamanho do inóculo, concentração do efluente, umidade e tempo | Chapla et al., 2010 |
| Box-Behnken | Concentração do substrato, umidade, concentração de nitrogênio e MgSO_4 | Gowdhaman et al., 2014 |
| Composto Central | Temperatura, pH, tamanho do inóculo e concentração substrato | Kaushal et al., 2015 |
| Box-Behnken | Umidade, pH e tamanho do inóculo | Zhang e Sang, 2015 |

Tabela 1.4 - Aplicação da MSR em estudos de hidrólise enzimática.

| Enzima | Tipo de reação | Parâmetros otimizados | Referência |
|---------------|-----------------------|------------------------------|-------------------|
|---------------|-----------------------|------------------------------|-------------------|

| | | | |
|---|---|--|-----------------------|
| Endoxilanase de <i>Trichoderma viridae</i> | Hidrólise de xilana de grama de <i>Sehima nervosum</i> para formar xilobiose e xilotriose | pH, temperatura, tempo de reação e dose de enzima | Samanta et al., 2012 |
| Xilanase bruta de <i>Aspergillus candidus</i> | Sacarificação de sabugo de milho | Temperatura, tempo de reação e dose de enzima | Garai e Kumar, 2013 |
| Celulase comercial | Sacarificação de palha de trigo | Concentração de substrato, dose de enzima e tempo de reação | Irfan et al., 2016 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | Sacarificação de palha de trigo | Carga de enzima, concentração de substrato, concentração de surfactante e tempo de hidrólise | Qi et al., 2009 |
| Preparo enzimático de co-cultura de <i>T. reesei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>A. flavus</i> | Sacarificação de palha de trigo | Dose de celulase, tempo de hidrólise e dose de β -glicosidase | Singh e Bishnoi, 2012 |
| Preparo enzimático de <i>Trichoderma</i> spp. | Sacarificação da planta halófito <i>Juncus maritimes</i> | Agitação, quantidade de enzima e quantidade de biomassa | Smichi et al., 2014 |

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de xilanase microbiana tem sido objeto de intensa investigação científica principalmente devido à possibilidade de utilização em diversos processos industriais e na sacarificação de resíduos agro-industriais. O desenvolvimento de bioprocessos que resultem em alta produtividade enzimática associada a baixos custos ainda é um dos principais fatores que impulsionam as pesquisas voltadas para produção destas enzimas. Especial atenção tem sido dada também as propriedades bioquímicas das xilanases. O estudo destas propriedades torna-se essencial para direcionar a utilização destas enzimas em processos específicos.

O resíduo proveniente do processamento de cajá apresenta uma natureza fibrosa, o que sugere uma composição rica em compostos lignocelulósicos, é proveniente de um fruto rico em nutrientes, tem sido gerado em uma quantidade relativamente expressiva, além de não possuir nenhum fim específico. Dessa forma, este resíduo, abundante e de baixo custo, pode-se tornar um substrato alternativo a ser utilizado em FES para produção de xilanases e outras enzimas.

A seleção de micro-organismos produtores de xilanase é também uma tarefa importante no desenvolvimento de um bioprocessos para obtenção desta enzima. Algumas espécies do gênero *Penicillium* têm sido indicadas como fontes de enzimas xilanolíticas. Entretanto, outras espécies, como, por exemplo, *Penicillium roqueforti*, tem sido muito pouco investigadas para produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido. *P. roqueforti* apresenta algumas características favoráveis à fermentação, que incluem o desenvolvimento em diferentes condições de pH e capacidade de utilizar pentoses e hexoses como substrato.

Portanto, o estudo da utilização de *P. roqueforti* em FES sob resíduo de cajá pode resultar em um bioprocessos alternativo para produção de xilanase, além de direcionar a utilização de resíduo de cajá como um material de baixo custo para bioconversão em produtos de valor agregado. Adicionalmente, o estudo bioquímico das xilanases produzidas bem como a verificação de seu potencial para sacarificação de agrosresíduos podem revelar novos catalisadores ambientalmente e economicamente favoráveis para a produção de açúcares importantes para a indústria de biocombustíveis e de alimentos.

1.5 REFERÊNCIAS

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

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 182-190, 2014.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51-57, 2016.

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.

ASSIS, M. M. M.; DA SILVA LANNES, S. C.; TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; TELIS-ROMERO, J. Influence of temperature and concentration on thermophysical properties of yellow mombin (*Spondias mombin*, L.). **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 585–593, 2006.

Atlas Online de Microbiologie. Disponível em: <<http://atlas.microumftgm.ro/micologie/filamentosipenroqueforti.php>>. Acesso em: 11 de Junho de 2016.

BAJPAI, P. Xylanases. In: SCHAECHTER, M., LEDERBERG, J. (Eds.), **Encyclopedia of Microbiology**, Third edition. Academic Press, San Diego, p. 600-612, 2009.

BAKRI, Y.; AL-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus niger* SS7 in submerged culture. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 249-251, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora Unicamp. 2001. 401p.

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

BCC RESEARCH. 2012. **Global markets for enzymes in industrial applications**. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/BIO030G.html>>. Acesso em 10/05/2015.

BEHNAM, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; SALIMIAN, Z. Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. **Biological Journal of Microorganism**, v. 4, n. 16, p. 1-10, 2016.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in Analytical Chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

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 Biochemistry**, v. 45, p. 120-128, 2010.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; CARVALHO, D. F.; TEIXEIRA, M. M. P.; DOS REIS CASTILHO, L.; FREIRE, D. M. G. Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste Biomass Valor**, v. 2, p. 291-302, 2011.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588-1602, 2015.

CAVALCANTE, L. F.; DE LIMA, E. M.; DE OLIVEIRA FREIRE, J. L.; PEREIRA, W. E.; DA COSTA, A. D. P. M.; CAVALCANTE, Í. H. L. Componentes qualitativos do cajá em sete municípios do brejo paraibano. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2009.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; DATTA, M.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHATURVEDI, S.; KOHLI, K. U.; RAJNI, S.; KHURANA, S. M. P. Statistical optimization of medium composition for xylanase production by solid state fermentation using agroresidues. **American Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 2, p. 85-92, 2015.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

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

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. 291-302, 2006.

DAMASO, M. C. T.; DE CASTRO, A. M.; CASTRO, R. M.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JR, N. Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1003-1012, 2004.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

DODD, D.; CANN, I. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, p. 2-17, 2009.

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, p. 1-12, 2005.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, SP. p.13, 2011.

FERNANDES, A.P. 2014. 135 p **Utilization of waste from dry and wet processing of coffee to obtain pectinases**. PhD Thesis, Federal University of Lavras, Brazil.

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. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr./jun. 2011.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015. 190p.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.

GARAI, D.; KUMAR, V. A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 352-363, 2013.

GHAFFARI-MOGHADDAM, M.; YEKKE-GHASEMI, Z.; KHAJEH, M.; RAKHSHANIPOUR, M.; YASIN, Y. Application of response surface methodology in enzymatic synthesis: A Review. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 252–262, 2014.

GHOSHAL, G.; BANERJEE, U. C.; SHIVHARE, U. S. Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 1013-1024, 2015.

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

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; CHERUPALLY, M.; NIDADAVOLU, N.; MANGAMURI, L. N.; ADDEPALLY, U. Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood Kraft pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p.2369–2380, 2012.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V. S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 90-98, 2014.

GRANATO, D.; RIBEIRO, J. C. B.; CASTRO, I. A.; MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, p. 899-906, 2010.

HANRAHAN, G.; LU, K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 141-151, 2006.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 179-184, 2006.

HENRISSAT, B. A. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309–316, 1991.

HÖLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-86, 2004.

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

IBBETT, R.; GADDIPATI, S.; DAVIES, S.; HILL, S.; TUCKER, G. The mechanisms of hydrothermal deconstruction of lignocellulose: new insights from thermal–analytical and complementary studies. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9272-9278, 2011.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q.; SHAKIR, H. A.; QAZI, J. I. Statistical optimization of saccharification of alkali pretreated wheat straw for bioethanol production. **Waste Biomass Valor**, v. 7, p. 1389-1396, 2016.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 9, p. 139-147, 2016.

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

JATINDER, K.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 169-176, 2006.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KAPILAN, R.; ARASARATNAM, V. Paddy husk as support for solid state fermentation to produce xylanase from *Bacillus pumilus*. **Rice Science**, v. 18, p. 36-45, 2011.

KAR, S.; GAURI, S. S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUSHAL, R.; SHARMA, N.; DOGRA, V. Optimization of the production and molecular characterization of cellulase-free xylanase from an alkalophilic *Bacillus subtilis* SD8 isolated from paper mill effluent. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 551–559, 2015.

KAUSHIK, P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 1-8, 2014.

KIM, T. H.; KIM, J. S.; SUNWOO, C.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 1, p. 39-47, 2003.

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, p. 903-917, 2014.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, p. 429–443, 2010.

KO, J. K.; XIMENES, E.; KIM, Y.; LADISCH, M. R. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 447-456, 2015.

KOCABAS, D. S.; GÜDERB, S.; ÖZBENC, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 170-177, 2012.

LEITE, P.; SALGADO, J. M.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 737-746, 2016.

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

LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; XU, Y.; ZHAO, H. Application of statistical experimental design to optimize culture requirements of *Aspergillus* sp. zh-26 producing xylanase for degradation of arabinoxylans in mashing. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. 320-329, 2007.

LIMA, A. T. B.; DE SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of cajá, *Spondias mombin* (Anacardiaceae), by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2893-2904, 2011.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, J.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 42, 3-40, 1998.

MANDER, P.; CHOI, Y. H.; PRADEEP, G. C.; CHOI, Y. S.; HONG, J. H.; CHO, S. S.; YOO, J. C. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 451-456, 2014.

MANIMARAN, A.; KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 887-893, 2009.

MIOSO, R.; MARANTE, T. F. J.; LAGUNA, I. H. B. *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 781-791, 2014.

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

MOHANA, S.; SHAH, A.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7553–7564, 2008.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; FIGUEIREDO, R. W. Processamento e utilização da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 2, jul./dez. 2011.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, R. C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. Wiley, New York, 2002.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7563–7569, 2010.

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, 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, p. 149-162, 1999.

PARK, Y.; KANG, S.; LEE, J.; HONG, S. L.; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 761-766, 2002.

PASTOR, F. I. J.; GALLARDO, O.; SANZ-APARICIO, J.; DÍAZ, P. Xylanases: Molecular properties and applications. In: Polaina, J.; MacCabe, A. P. (eds.) **Industrial enzymes: structure, function and applications**, Springer, p. 70-73, 2007.

PENSUPA, N.; JIN, M.; KOKOLSKI, M.; ARCHER, D. B.; DU, C. A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 261-267, 2013.

PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em Química: maximizando a obtenção de resultados**. São Paulo: EdUFSCar, 2015. 88p.

PERIČIN, D. M.; MADAREV, S. Z.; RADULOVIC, L. M.; ŠKRINJAR, M. M. Exo polygalacturonase production by *Penicillium roqueforti* on pumpkin oil cake in solid state fermentation. **Acta periodica technologica**, ed. 38, p. 127-137, 2007.

PERICIN, D.; MADAREV-POPOVIC, S.; RADULOVIC-POPOVIC, L.; SKRINJAR, M. Evaluate of pumpkin oil cake as substrate for the cellulase production by *Penicillium roqueforti* in solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 13, n. 4, p. 3815-3820, 2008.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DA SILVA DELABONA, P.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; NETO, V. B.; FARINAS, C. S. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013.

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

PITT, J. I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* Species**. CSIRO, Food Research Laboratory, North Ryde, Austrália, 1988.

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

QI, B.; CHEN, X.; SHEN, F.; SU, Y.; WAN, Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009.

REZAEI, F.; JOH, L. D.; BERRY, A. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Xylanase and cellulase production by *Acidothermus cellulolyticus* grown on switchgrass in solid-state fermentation. **Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2011.

RIVERA-MUÑOZ, G.; TINOCO-VALENCIA, J. R.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 277-280, 1991.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; COURI, S.; NETO, V. B.; CRESTANA, S.; FARINAS, C. S. Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 142-152, 2013.

SACRAMENTO, C. K.; BARRETO, W. S. Frutas tropicais não tradicionais para o cultivo no Brasil. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22, 2012, 11 p. Bento Gonçalves, **Anais...** Rio Grande do Sul, 2012.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. Cajá. In: Janay Almeida dos Santos-Serejo, Jorge Luiz Loyola Dantas, Clovis Vaz Sampaio, Ygor da Silva Coelho. (Org.). **Fruticultura Tropical- Espécies Nativas e Exóticas**, Brasília, DF: Embrapa, 2009, v. 1, p. 83-105.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F.X. de. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 42p. (Frutas Nativas)

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*). **Bioresource Technology**, v. 112, p. 199-205, 2012.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; MACHADO, F. D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; FRANCO, M. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2013.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SANTOS, T. C. D.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R. D.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222-233, jan/mar., 2016.

SANTOS-SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília, DF, 2009.

SCHMIDT, A.; KRATKY, C.; SCHLACHER, A.; SCHWAB, H.; STEINER, W. Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. **Protein Science**, v. 7, n. 10, p. 2081-2088, 1998.

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97-107, 2015.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. **Bioresource technology**, v. 108, p. 94-101, 2012.

SMICHI, N.; MESSAOUDI, Y.; KSOURI, R.; ABDELLY, C.; GARGOURI, M. Pretreatment and enzymatic saccharification of new phytoresource for bioethanol production from halophyte species. **Renewable Energy**, v. 63, p. 544-549, 2014.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1561–1569, 2005.

SOUZA, F. X.; SOUSA, F. H. L.; FREITAS, J. B. S.; ROSSETTI, A. G. Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1 p. 215-220, 2000.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; DE OLIVEIRA GODOY, R. L.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326–2331, 2011.

VICUNA, R.; OYARZUN, E.; OSSES, M. Assessment of various commercial enzymes in the bleaching of radiata pine Kraft pulps. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 63-168, 1995.

VIDIGAL, M. C.; MINIM, V. P.; CARVALHO, N. B.; MILAGRES, M. P.; GONÇALVES, A. C. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v. 44, p. 1988-1996.

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.

VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation, **Mycobiology**, v. 39, p. 20-25, 2011.

WALIA, A.; MEHTA, P.; GULERIA, S.; SHIRKOT, C. K. Improvement for enhanced xylanase production by *Cellulosimicrobium cellulans* CKMX1 using central composite design of response surface methodology. **3 Biotech**, v. 5, p. 1053–1066, 2015.

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.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52, p. 305-317, 1988.

YU, Q.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; QI, W.; WANG, W.; WANG, Q.; TAN, X. Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. **Bioresource technology**, v. 144, p. 210-215, 2013.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy and Fuels**, Washington, v. 22, p 46-60, 2008.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 101-110, 2015.

CAPÍTULO 2

Resíduo de cajá como matéria-prima de baixo custo para produção de xilanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido

Resumo: Este estudo objetivou avaliar a utilização de resíduo de cajá como substrato alternativo para produção de xilanase 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 como meio de cultura pó de resíduo de cajá ou pó de resíduo de cajá submetido a um processo de extração sólido-líquido com etanol puro, ambos umidificados com água destilada. Os parâmetros temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação foram otimizados utilizando a metodologia de superfície de resposta com o auxílio do planejamento Box-Behnken. Utilizando o resíduo não processado com etanol foi alcançada uma máxima atividade de xilanase de 14,03 UI/g sob as condições de temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação de 25,55 °C, 60,55% e 141,80h, respectivamente. Ao passo que utilizando o resíduo processado com etanol foi alcançada uma máxima atividade de 6,24 UI/g sob as condições de temperatura de 24,95°C, umidade de 66,24% e tempo de fermentação de 126,24h.

Palavras-chave: Agroresíduo. Bioconversão. Fungo filamentosos. Planejamento Box-Behnken. Produção de enzima. *Spondias mombin* L.

Yellow mombin residue as raw material of low cost for xylanase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation

Abstract: This study aimed to evaluate the use of yellow mombin residue as a substrate for xylanase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation. The experiments were conducted in the Biotransformation and Organic Biocatalysis Laboratory, located at the State University of Santa Cruz - UESC. The Fermentation assays were performed using yellow mombin residue powder or yellow mombin residue powder subjected to a process of solid-liquid extraction with pure ethanol as culture media, both moistened with distilled water. The parameters such as incubation temperature, initial moisture and fermentation time were optimized using response surface methodology with the help of Box-Behnken design. Using the unprocessed residue it was achieved maximum xylanase activity of 14.03 IU/g under the conditions of incubation temperature, initial moisture and fermentation time of 25.55°C, 60.55% and 141.80h, respectively. While using the processed residue it was achieved a maximal activity of 6.24 IU/g under the conditions of temperature of 24.95°C, moisture 66.24% and fermentation time of 126.24h.

Keywords: Agroresidue. Bioconversion. Box-Behnken Design. Enzyme production. Filamentous fungus. *Spondias mombim* L.

2.1 INTRODUÇÃO

A demanda cada vez maior por produtos agrícolas tem levado a produção de uma grande quantidade de resíduos sem fins específicos, os quais são em sua maioria incinerados ou descartados como lixo orgânico causando poluição ambiental (Mander et al., 2014; Santos et al., 2012). No setor agro-industrial brasileiro, pode-se destacar o resíduo proveniente do processamento do cajá (*Spondias mombim* L.). Este fruto tem apresentando expressivo aumento da sua participação nos diversos setores comerciais e regionais do país, principalmente, pela possibilidade de consumo *in natura* e na forma processada, como geleias, sorvetes, polpas, vinhos e licores (Cavalcante et al., 2009; Santos-Serejo et al., 2009). Estima-se que no processamento do cajá seja gerado entre 20 e 40% de seu peso de resíduos, compostos de restos de cascas e endocarpos, que não possuem um fim específico (Moura et al., 2011).

A maioria dos agroresíduos consiste de polissacarídeos hemicelulósicos e nutrientes que os tornam potencialmente úteis como matérias-primas para produção de xilanase microbiana utilizando técnicas de fermentação (Fang et al., 2010; Kaushik et al., 2014; Kapilan e Arasaratnam, 2011; Song e Wei, 2010; El-Bakry et al., 2015). Xilanase (EC 3.2.1.8 e EC 3.2.1.37) é um grupo de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de xilanas para formar xilo-oligossacarídeos e xilose. Nos últimos anos, estas enzimas têm recebido crescente atenção devido à possibilidade de aplicação em diversos processos de produção industrial, que incluem a produção de bioetanol, aditivos alimentares, clarificação de sucos de frutas, bem como na conversão de resíduos lignocelulósicos em compostos químicos de valor agregado (Deutschmann e Dekker, 2012; Kamble e Jadhav, 2012; Collins et al., 2005; Subramaniyan e Prema, 2002).

As xilanases podem ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos. Dentre estes, os fungos filamentosos vêm sendo amplamente estudados e indicados como potenciais produtores devido à capacidade de excretar enzimas degradantes de xilanas eliminando a necessidade de ruptura celular para recuperação de enzimas,

além de, geralmente, produzirem quantidades elevadas de xilanase (Pal e Khanum, 2010; Brijwani et al., 2010; Kar et al., 2013; Bajpai et al., 2009).

A produção de xilanase fúngica utilizando resíduos agro-industriais como substrato de fermentação pode ser mais eficiente utilizando a FES, cuja técnica permite o cultivo de micro-organismos sobre estes resíduos que atuam como suporte e fonte de carbono e energia. Além disso, simula o *habitat* natural o qual os fungos filamentosos estão adaptados (Pirota et al., 2013; Ang et al., 2013; Pandey, 2003). Alguns fatores ambientais e de fermentação tais como tempo de fermentação, temperatura de incubação e umidade do meio de cultura, podem influenciar o rendimento da produção de xilanase mediada pelo metabolismo microbiano (Castro et al., 2015; Ghoshal et al., 2015). Assim, para a produção comercial, a otimização destes fatores torna-se um passo essencial para garantir uma produção enzimática mais elevada associada a menores custos (Lakshmi et al., 2009). Nesse sentido, a utilização da metodologia de superfície de resposta (MSR) é indicada como uma ferramenta estatística promissora, pois permite predizer a melhor condição de cada variável e os efeitos de interação. Outra vantagem é o reduzido número de experimentos necessários (Myers e Montgomery, 2002; Steinberg e Bursztyn, 2010).

Fungos do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* têm sido indicados como bons produtores de enzimas xilanolíticas (Knob e Carmona, 2010; Li et al., 2007). Os dois primeiros gêneros têm sido amplamente estudados e revisados, ao passo que relatórios relevantes sobre cepas de *Penicillium* são relativamente escassas (Zhang e Sang, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e otimizar a produção de xilanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido utilizando resíduo de cajá, seco ou seco e submetido a extração com etanol, como substrato de fermentação alternativo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção e preparo do resíduo

As amostras de resíduo de cajá foram gentilmente fornecidas por uma fábrica de sucos e polpas de fruta localizada na cidade de Feira de Santana (Bahia, Brasil). O material foi lavado em água corrente de torneira sendo, posteriormente, feita a

secagem ao sol durante um período de 24 horas e em estufa com circulação forçada de ar por mais 24 horas a 65°C. Após a secagem, o resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Willye, com abertura de 2 mm, e peneirado (18 mesh). O material assim obtido foi denominado resíduo de cajá (RC) (Figura 2.1a). Este foi então submetido a três extrações (maceração) consecutivas com etanol absoluto por 48 horas. O sólido residual foi exposto à luz solar durante 7 dias sendo, posteriormente, secado em estufa com circulação de ar por mais 48 h, 65°C, e peneirado (18 mesh), obtendo-se assim o resíduo de cajá submetido a um processo de extração (RCE) (Figura 2.1b).

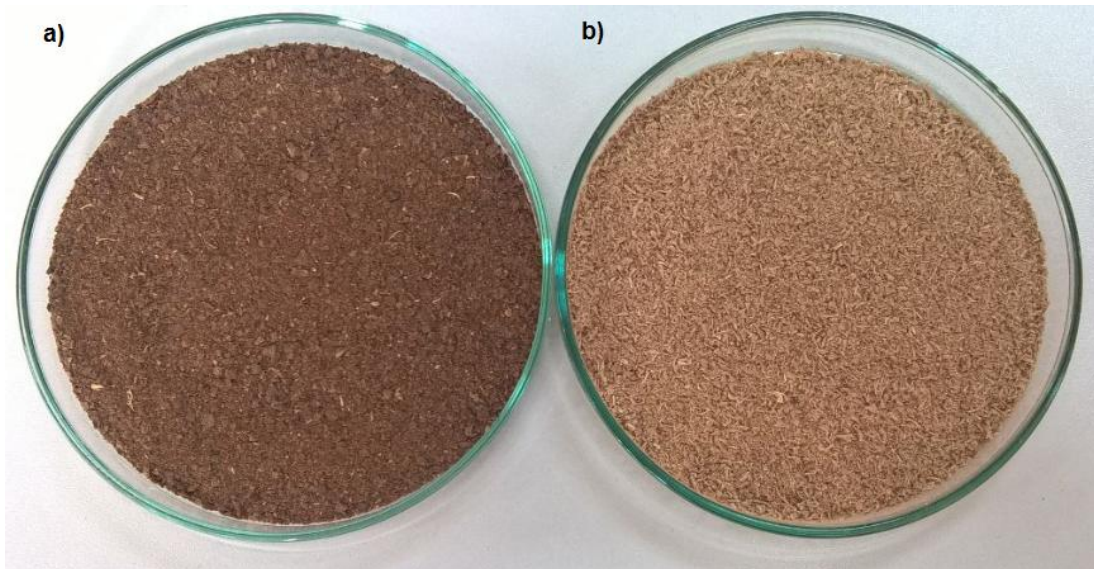


Figura 2.1 - Resíduos de cajá utilizados como substratos na FES para produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110. **(a)** resíduo seco (RC) e **(b)** submetido a extração com etanol e seco (RCE).

2.2.2 Obtenção e cultivo do micro-organismo

O micro-organismo utilizado para os ensaios de fermentação foi o *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, o qual foi obtido da coleção de micro-organismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil) sob o registro de número 40074 e lote 041140074. Este fungo vem sendo preservado em meio de sílica e glicerol a -80°C em ultrafreezer. A repicagem das cepas foi feita em meio de cultura de ágar-dextrose-batata (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 25°C por 7 dias ou até

esporulação abundante (observado visivelmente devido a coloração verde da colônia) sendo, posteriormente, conservadas a 4°C para utilização posterior.

2.2.3 Preparo do inóculo

O preparo da suspensão de esporos foi realizado utilizando-se o micro-organismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 25°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 ambiente de incubadora BOD com temperatura controlada utilizando frascos Erlenmeyer de 100 mL como biorreator e pó de resíduo de cajá como único substrato. Cada frasco contendo 5g de resíduo foi submetido a 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. Foram adicionados ao meio a quantidade de 10^8 esporos por grama de substrato e água destilada esterilizada até atingir umidade desejada. A fim de avaliar a influência das variáveis independentes umidade inicial (%), temperatura de incubação (°C) e tempo de fermentação (h) sobre a produção de xilanase, foi aplicado o planejamento Box-Behnken. Os níveis das variáveis estudadas e a técnica de planejamento experimental utilizada estão descritas no item 2.2.7.

2.2.5 Extração enzimática

Após a etapa de fermentação, foram adicionados aos meios fermentados 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) para cada 1 g de resíduo. As misturas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Shaker) por 20

minutos a 170 rpm e 35°C. O conteúdo inteiro de cada frasco foi prensado (prensa mecânica) através de gaze, para separar o sólido do extrato enzimático, e o filtrado foi coletado em tubo Falcon 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 xilanase

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos com base em procedimentos padrão recomendados pela IUPAC (Ghose e Bisaria, 1987). A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de 1 mL de xilana de “beechwood” (Sigma®), na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído) em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Para o controle da reação foram incubados 1 mL de tampão citrato de sódio com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído), enquanto que o branco de reação consistiu de 1 mL de tampão citrato de sódio e 1 mL da solução de xilana. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método de Miller (1959), adicionando-se 2 mL de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) aos meios de reação seguido de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente de torneira. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e a quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada usando xilose como padrão (1 a 10 µmol/mL).

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 xilanases

Foi utilizado o planejamento Box-Behnken para investigar a influência de diferentes fatores sobre a produção de xilanase 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 RC e a outra para o substrato RCE. Cada 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 e para ajustar um modelo de segunda ordem com termos quadráticos. A atividade de xilanase (UI/g) foi escolhida como valor de resposta e os fatores umidade inicial (% m/m), temperatura de incubação (°C) e tempo de fermentação (h), foram selecionados como variáveis independentes, sendo avaliados em três níveis, baixo, médio e alto, que foram codificados como -1, 0 e +1, respectivamente. Os valores reais e codificados podem ser observados nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1 - Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de xilanase utilizando RC.

| Variáveis | Símbolo | Níveis | | |
|-------------------------------|---------|--------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura de incubação (°C) | T | 20 | 25 | 30 |
| Umidade inicial (%) | UD | 40 | 55 | 70 |
| Tempo de fermentação (h) | T | 72 | 120 | 168 |

Tabela 2.2 - Variáveis e níveis do planejamento Box-Behnken para a otimização da produção de xilanase utilizando RCE.

| Variáveis | Símbolo | Níveis | | |
|-------------------------------|---------|--------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura de incubação (°C) | T | 20 | 25 | 30 |
| Umidade inicial (%) | UD | 50 | 65 | 80 |
| Tempo de fermentação (h) | T | 72 | 120 | 168 |

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.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1+1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (2.1)$$

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 versão 10 (STATSOFT) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos a partir das condições do planejamento Box-Behnken aplicado para otimização da produção de xilanases empregando-se RC e RCE podem ser observados na Tabela 2.3. Os valores da resposta são o resultado médio da triplicata realizada nos ensaios de determinação da atividade enzimática.

Uma análise preliminar da Tabela 2.3 permitiu verificar que o fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 foi capaz de sintetizar xilanases utilizando qualquer um dos resíduos como substrato e em todas as combinações das variáveis investigadas de acordo ao planejamento. Uma possível explicação é a capacidade desse micro-organismo de desenvolver-se bem em substratos de diferentes natureza e sob diferentes condições de temperatura (entre 4 e 35°C) e oxigênio (Abbas e Dobson, 2011). Além disso, os substratos utilizados possuem natureza fibrosa (Souza et al., 2000), indicando alta concentração de hemicelulose, o que pode ter induzido a produção de xilanases pelo micro-organismo. *P. roqueforti* já foi investigado para produção de enzimas celulolíticas utilizando a FES, onde foi apontado como uma espécie promissora (Pericin et al., 2008).

Tabela 2.3 - Matriz do tipo Box-Behnken para a análise dos fatores temperatura (T, °C), umidade inicial (UD, %) e tempo de fermentação (t, h) sobre a atividade de xilanase (Y) produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em dois substratos: resíduos de cajá seco (RC) e seco e tratado com extração por etanol (RCE).

| Experimento | T | UD | t | Atividade de xilanase (UI/g) | |
|-------------|----|----|----|------------------------------|-----------|
| | | | | Y_{RC} | Y_{RCE} |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 11,46 | 5,90 |
| 2 | +1 | -1 | 0 | 12,54 | 4,93 |
| 3 | -1 | +1 | 0 | 12,95 | 5,21 |
| 4 | +1 | +1 | 0 | 12,81 | 5,76 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 8,36 | 3,97 |
| 6 | +1 | 0 | -1 | 9,44 | 4,25 |
| 7 | -1 | 0 | +1 | 12,54 | 5,76 |
| 8 | +1 | 0 | +1 | 13,08 | 4,93 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 9,58 | 3,83 |
| 10 | 0 | +1 | -1 | 10,12 | 4,11 |
| 11 | 0 | -1 | +1 | 12,95 | 3,97 |
| 12 | 0 | +1 | +1 | 13,08 | 4,66 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 13,76 | 6,59 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 13,83 | 6,45 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 13,65 | 6,42 |

Apesar de ter se alcançado a produção da enzima sob as diferentes condições do planejamento, pôde-se observar que a variação dos níveis dos fatores resultou em valores discrepantes de atividade de xilanase. Utilizando o substrato RC, as condições dos experimentos 13, 14 e 15 resultaram em uma maior produção de xilanase, onde as variáveis temperatura, umidade e tempo foram mantidas em 25°C, 55% e 120h, respectivamente. Para o substrato RCE, maior produção da enzima também foi alcançada quando as condições foram mantidas no nível central, neste caso, temperatura a 25°C, umidade 65% e tempo de 120 h.

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 (Figuras 2.2 e 2.3). Neste tipo de gráfico, o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado (relação entre o efeito e o erro normal) de cada um dos coeficientes é traçado em ordem decrescente e comparada com magnitude de um fator estatisticamente significativo (Santos et al., 2016). Admitindo um nível de confiança de 95%, representada pela linha vertical traçada, apenas os termos de interação T*t (temperatura e tempo) e UD*t (umidade e tempo) foram insignificantes quando utilizado o substrato RC (Figura 2.2). O efeito significativo de todos os termos lineares sugeriu que as três variáveis investigadas foram críticas para a produção de xilanases, sendo a variável tempo a de maior influência. Para RCE (Figura 2.3), além do efeito de interação UD*t (umidade e tempo), o efeito do termo linear da temperatura (T) foi insignificante, indicando as variáveis tempo e umidade como as mais críticas para produção da enzima. 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 ($p < 0,05$) (Tabelas 2.4 e 2.5).

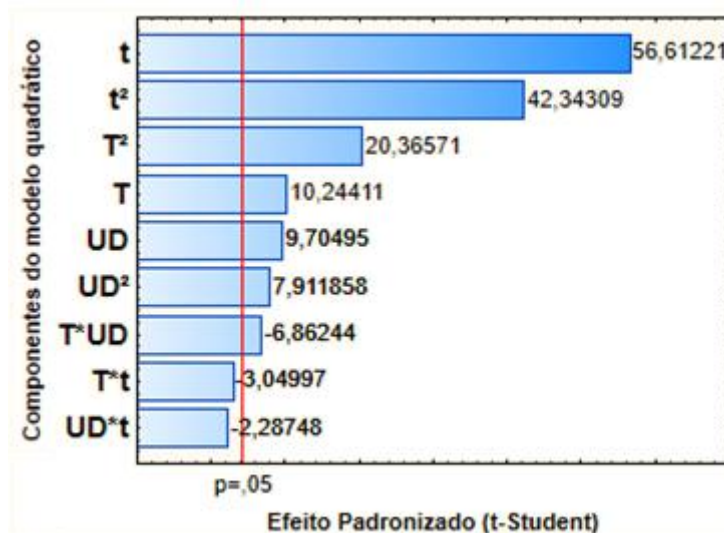


Figura 2.2 - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação (T), umidade inicial (UD) e tempo de fermentação (t) no modelo ajustado para produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando RC (T*UD: interação entre os termos lineares T e UD; T*t: interação entre os termos lineares T e t; UD*t: interação entre os termos lineares UD e t).

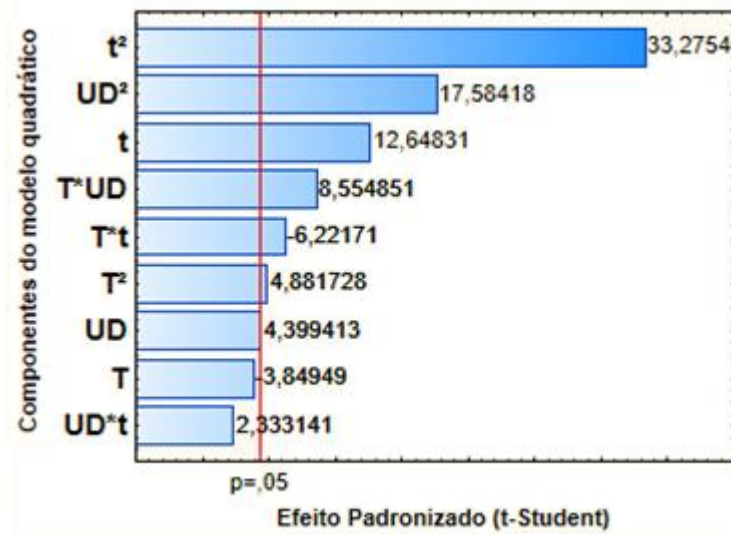


Figura 2.3 - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação (T), umidade inicial (UD) e tempo de fermentação (t) no modelo ajustado para a produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando RCE ($T*UD$: interação entre os termos lineares T e UD; $T*t$: interação entre os termos lineares T e t; $UD*t$: interação entre os termos lineares UD e t).

Tabela 2.4 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RC.

| | SQ | GL | QM | F | P |
|-----------------|---------|----|--------|--------|---------|
| Regressão | 43,4202 | 7 | 6,2029 | 71,544 | <0,0001 |
| Resíduo | 0,6069 | 7 | 0,0867 | | |
| Total | 44,0271 | 14 | | | |
| Falta de ajuste | 0,5913 | 5 | 0,1183 | 15,116 | 0,063 |
| Erro puro | 0,0156 | 2 | 0,0078 | | |

$R^2 = 0,9862$; $R^2\text{-adj} = 0,9724$; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; P, probabilidade.

Tabela 2.5 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RCE.

| | SQ | GL | QM | F | P |
|-----------------|---------|----|--------|--------|--------|
| Regressão | 12,7777 | 7 | 1,8254 | 19,242 | 0,0005 |
| Resíduo | 0,6640 | 7 | 0,0949 | | |
| Total | 13,4417 | 14 | | | |
| Falta de ajuste | 0,6483 | 5 | 0,1297 | 16,512 | 0,058 |
| Erro puro | 0,0157 | 2 | 0,0079 | | |

$R^2 = 0,9506$; $R^2\text{-adj} = 0,9012$; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; P, probabilidade.

A significância dos parâmetros da ANOVA pode ser verificada com base no p-valor, ou nível descritivo de teste. Ao nível de 95% de confiança, um p-valor para a regressão menor que 0,05 sugere que o modelo é estatisticamente significativo. Já a qualidade dos modelos pode ser verificada através do coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2 -adj) e pela significância da falta de ajuste. O valor de R^2 é interpretado como a proporção de variação total da variável dependente (Y) que é explicada pela variação das variáveis independentes (X). Entretanto, a presença de termos estatisticamente insignificantes pode resultar em modelos com alto valor de R^2 e pobre poder de previsão, sendo conveniente observar também o R^2 -ajustado, que corrige os valores de R^2 com base no tamanho e número de termos do modelo. A falta de ajuste mede a falha do modelo em representar pontos dentro do domínio experimental que não estão incluídos na análise de regressão, sendo, portanto, considerado um parâmetro importante a ser avaliado para construção de modelos matemáticos com alto poder de previsão (Garai e Kumar, 2013; Sharma et al., 2009).

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 2.4 e 2.5, foi possível observar que os modelos matemáticos construídos para RC ($p < 0,0001$) e RCE ($p = 0,0005$) foram ambos estatisticamente significativos. Os valores de R^2 e R^2 -adj para o modelo em RC (0,9862 e 0,9724, respectivamente) e em RCE (0,9506 e 0,9012, respectivamente) indicaram que os modelos ajustaram muito bem aos resultados experimentais (Haaland, 1989). Um valor de R^2 de 0,9862 quando utilizado RC significou que 98,62% da variabilidade das respostas de atividade xilanase puderam ser explicadas pelo modelo reduzido ao passo que um valor de R^2 de 0,9506 quando utilizado RCE significou que 95,06% da variação das respostas de atividade de xilanase puderam ser explicadas pelo modelo ajustado. Os valores de falta de ajuste foram insignificantes para ambos os modelos ($p = 0,063$ e $p = 0,058$ para RC e RCE, respectivamente). Para melhor verificar o ajuste dos modelos reduzidos, foram avaliados os gráficos de valores reais e previstos e o gráfico de resíduos representados nas Figuras 2.4 e 2.5. A partir destes gráficos, ficou evidente que ambos os modelos reduzidos apresentaram os valores das respostas previstas muito próximos aos valores das respostas experimentais, o que condiz com os resultados de R^2 e R^2 -adj, sugerindo boa correlação entre os valores reais e previstos. Além disso, com base nos gráficos de resíduos (Figuras 2.4b e 2.5b), foi possível observar também que os resíduos foram relativamente baixos e distribuídos

de forma aleatória. Dessa forma, esses modelos foram considerados válidos para construção de superfícies de respostas e previsão das regiões desejadas.

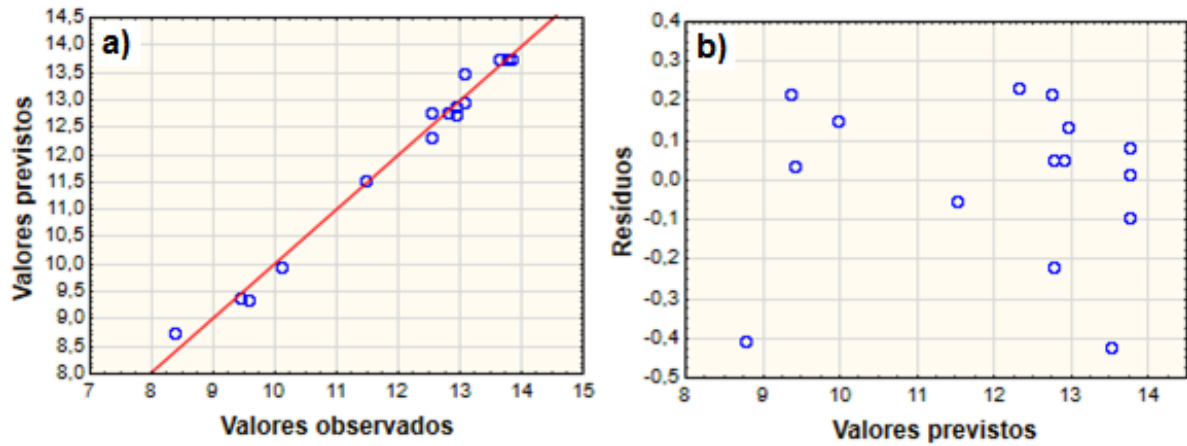


Figura 2.4 - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RC.

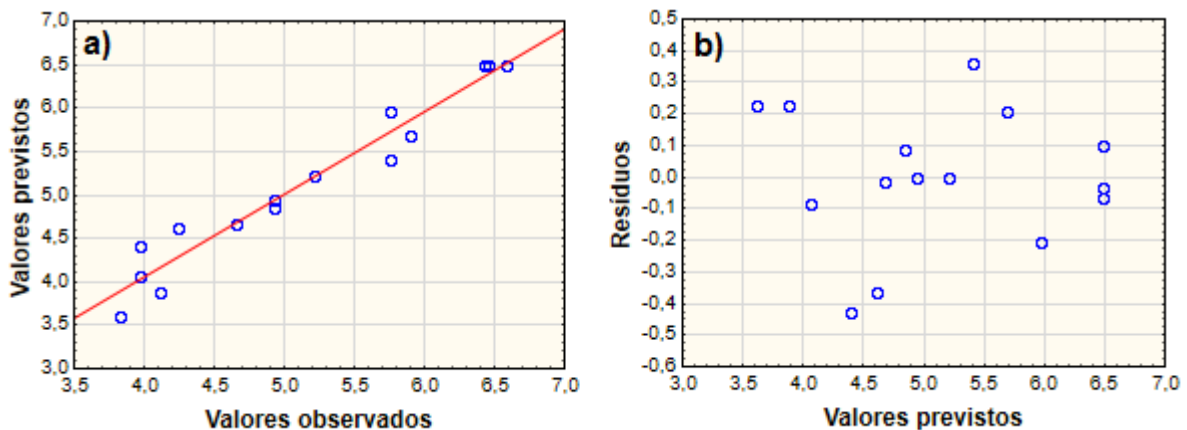


Figura 2.5 - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado quando utilizado RCE.

As equações 2.2 e 2.3 expressam os modelos reduzidos quadráticos de segunda ordem construídos para RC e RCE, respectivamente, onde Y_{RC} representa as respostas de atividade de xilanase previstas quando utilizado o substrato resíduo de cajá e Y_{RCE} as respostas previstas quando utilizado o resíduo de cajá pré-tratado. T, UD e t, são as variáveis independentes temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação em valores codificados, respectivamente.

$$Y_{RC} = - 13,74 + 0,32 T - 0,94 T^2 + 0,30 UD - 0,36 UD^2 + 1,77 t - 1,95 t^2 - 0,30 T*UD \quad (2.2)$$

$$Y_{RCE} = 6,49 - 0,23 T^2 + 0,14 UD - 0,81 UD^2 + 0,40 t - 1,53 t^2 + 0,38 T*UD - 0,28 T*t \quad (2.3)$$

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno dispostos nas Figuras 2.6 e 2.7, construídos a partir das equações 2.2 e 3.3, respectivamente, ilustram o efeito das variáveis e suas interações. A partir destes gráficos, foi possível confirmar que, dentro do domínio experimental investigado, a variável tempo de fermentação exerceu maior influencia na produção de xilanase quando utilizado o substrato RC. Um aumento no tempo de fermentação até certo ponto resultou em uma maior atividade de xilanase, sendo apontado um decréscimo a partir de 158h e uma faixa de tempo de máxima produção em 128-158h.

Comportamento semelhante foi observado quando utilizado o substrato RCE, sendo a faixa 120-130h estimada como a melhor para síntese enzimática. Após 130h de fermentação foi apontada uma queda na produção. De acordo com Santos et al. (2016), o efeito do tempo de fermentação pode estar relacionado à presença de macro e micronutrientes no meio de fermentação. A princípio, a produção de enzimas é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo e então decresce devido ao esgotamento de nutrientes, o que leva ao decaimento do crescimento microbiano e, conseqüentemente, diminuição da produção enzimática. Ghoshal e colaboradores (2015) utilizando o fungo *Penicillium citrinum* MTCC 9620 sob FES em bagaço de cana-de-açúcar encontraram uma máxima produção de xilanase no tempo de fermentação de 120h. Irfan e colaboradores (2014) encontraram uma melhor produção em 168h de fermentação empregando o fungo *Trichoderma viride*-IR05. Murthy e Naidu (2012) encontram máxima produção enzimática em um tempo de fermentação de 120h empregando *Penicillium* sp. CFR 303 e coprodutos de café como substrato.

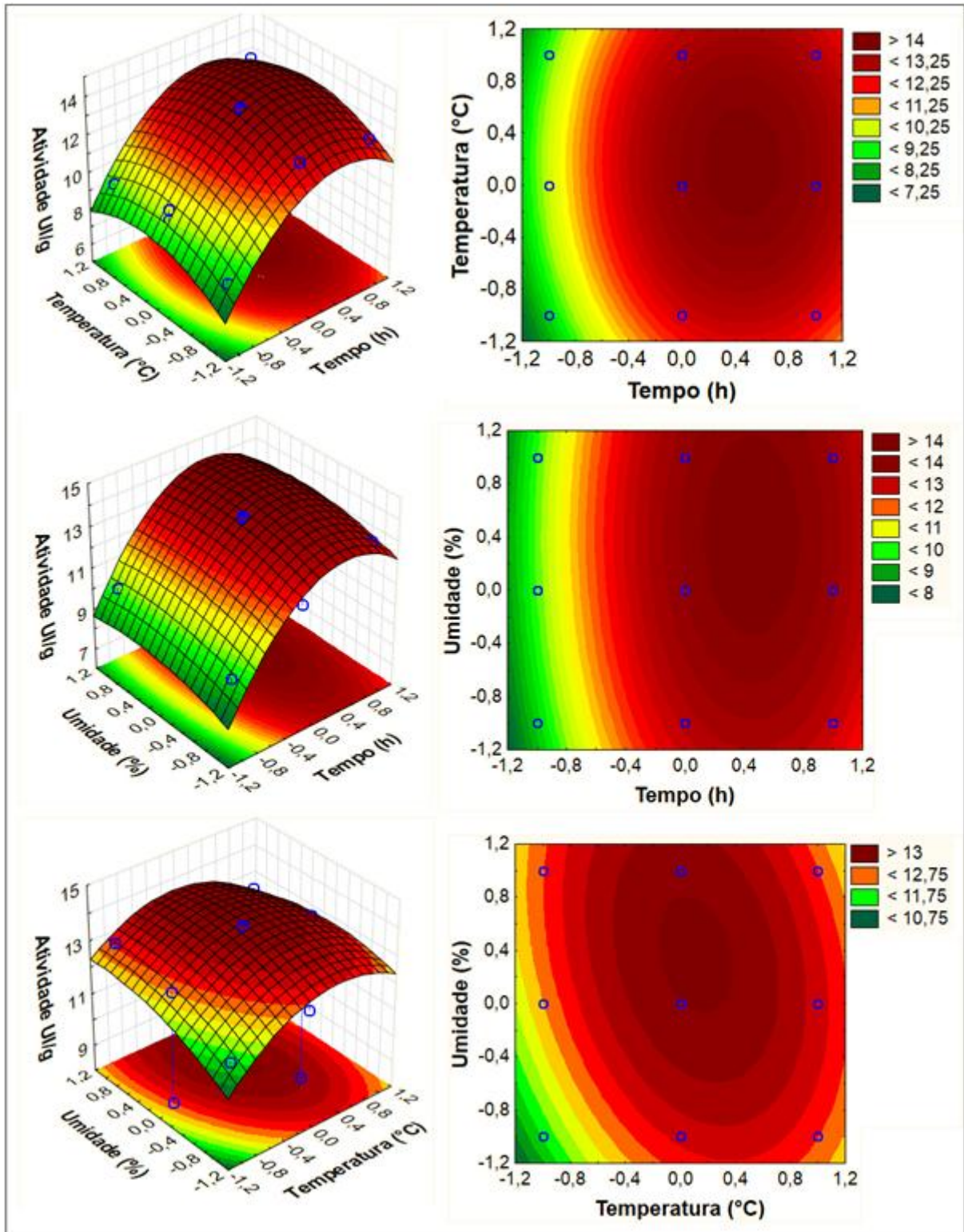


Figura 2.6 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y_{RC} representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de xilanase.

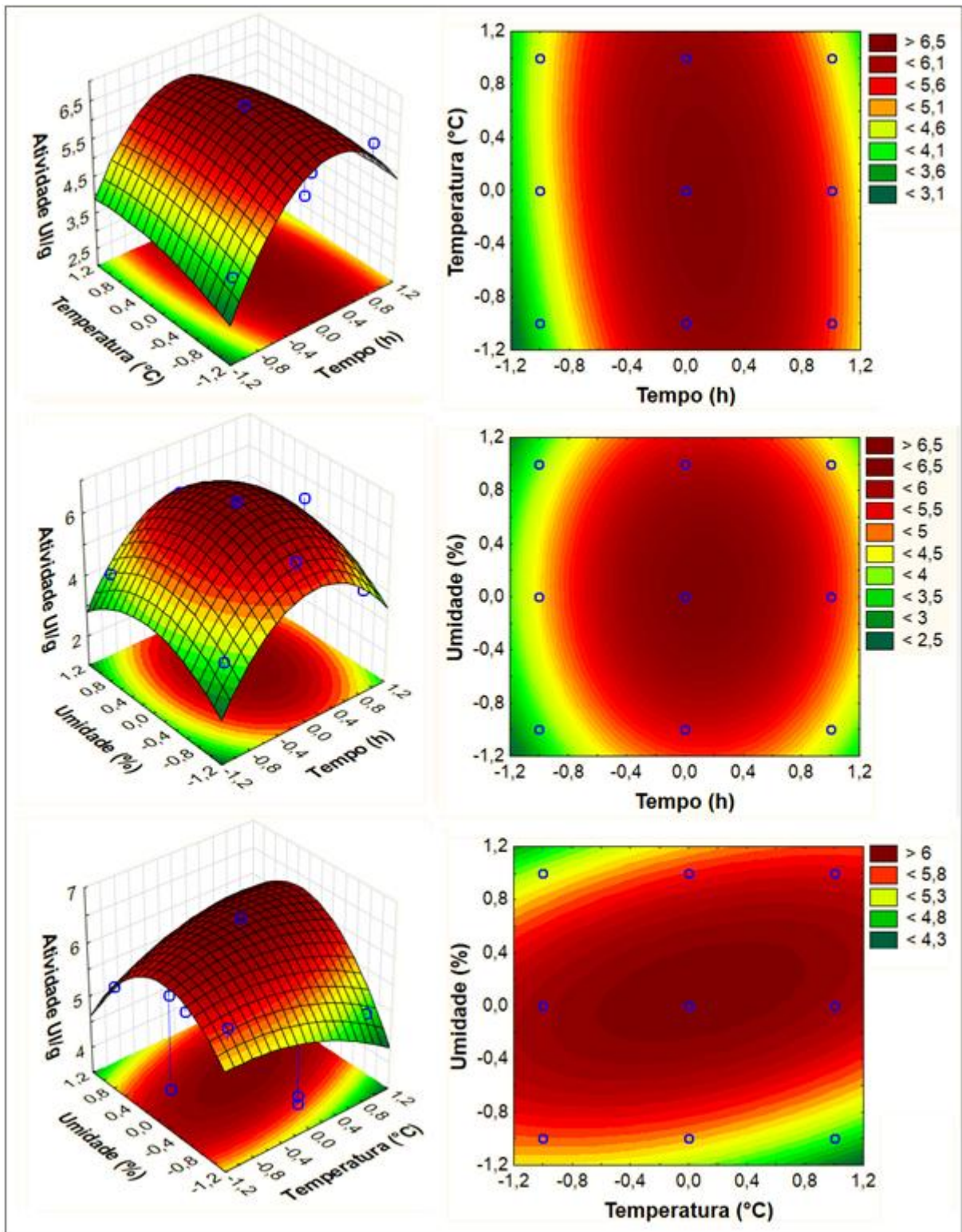


Figura 2.7 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y_{RCE} representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação, tendo-se como resposta a atividade de xilanase.

Em relação a variável temperatura, para RC foi apontado uma melhor região para a produção de xilanase em torno do nível central (25°C). Para RCE foi observado uma faixa de 22-29 °C. Temperaturas similares foram encontradas por Garai e Kumar (2013) e Goyal et al. (2008) utilizando os fungos *Aspergillus candidus* e *Trichoderma viride*, respectivamente.

Cultivos em temperaturas muito baixas podem ser desfavoráveis ao desenvolvimento microbiano, podendo ocorrer diminuição no metabolismo microbiano e conseqüentemente redução na produção enzimática. Por outro lado, tem sido sugerido que em altas temperaturas os micro-organismos canalizam a energia obtida do substrato para sintetizar apenas uma quantidade reduzida de proteínas necessárias para seu crescimento e processos fisiológicos, além disso, altas temperaturas podem provocar mudanças na estrutura tridimensional de enzimas provocando sua desnaturação (Pal e Khanum, 2010; Borzani, 2001).

Outro parâmetro considerado crítico para a formação de produtos por FES é o conteúdo de umidade (Singhania et al., 2009). Se os níveis de umidade estiverem acima ou abaixo do valor ótimo a atividade do micro-organismo e, conseqüentemente, a produção de enzimas pode ser afetada. Um baixo conteúdo de umidade causa redução na solubilidade de nutrientes do substrato, baixo grau de molhabilidade e maior tensão da água, podendo resultar em diminuição do crescimento microbiano e, eventualmente, menor produção enzimática. Por outro lado, altos níveis de porosidade podem resultar na diminuição da porosidade do substrato, limitando a transferência de oxigênio, e provocando aderência de partículas do substrato na parede do biorreator, tornando o meio mais vulnerável à contaminação (Kapilan e Arasaratnam, 2011).

Neste trabalho, para ambos os substratos utilizados, foi observado que, dentro do domínio experimental investigado, os níveis extremos resultaram em uma diminuição da produção de xilanase, sendo indicada uma faixa de melhor produtividade de 52-67% para RC e 62-72% para RCE. Zhang e Sang (2015) utilizando o fungo *Penicillium chrysogenum* QML-2 sob fermentação em mistura de pó de palha de milho e farelo de trigo encontraram um valor ótimo de umidade de 74%. Park et al. (2002) obteve um valor ótimo de umidade inicial de 65% utilizando *Aspergillus niger* e palha de arroz com substrato.

Para se determinar os pontos de estacionaridade das equações 2.2 e 2.3 foi utilizado o critério de Lagrange. Este procedimento permite verificar a existência de

pontos de máximo, mínimo ou sela de uma função, sendo a determinação desses pontos realizada através do determinante de Hessian. Para uma função quadrática contendo três variáveis os determinantes podem ser quantificados de acordo com as equações 2.4, 2.5 e 2.6 e os pontos críticos podem ser obtidos pela resolução do sistema representado na equação 2.7 (Ferreira et al., 2015).

$$\Delta_1 = \left| \frac{\partial^2 R}{\partial X_1^2} \right| \quad (2.4)$$

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial X_1^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_1 \partial X_2} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial X_1 \partial X_2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_2^2} \end{vmatrix} \quad (2.5)$$

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 R}{\partial X_1^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_1 \partial X_2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_1 \partial X_3} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial X_2 \partial X_1} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_2^2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_2 \partial X_3} \\ \frac{\partial^2 R}{\partial X_3 \partial X_1} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_3 \partial X_2} & \frac{\partial^2 R}{\partial X_3^2} \end{vmatrix} \quad (2.6)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial R}{\partial X_1} &= 0 \\ \frac{\partial R}{\partial X_2} &= 0 \\ \frac{\partial R}{\partial X_3} &= 0 \end{aligned} \quad (2.7)$$

Os determinantes encontrados para RC, em valores codificados, foram: $\Delta_1 = -1,875$; $\Delta_2 = 1,273$ e $\Delta_3 = -4,964$, revelando que o modelo analisado exibiu uma condição de máximo em um específico ponto estacionário, como já poderia ser facilmente constatado através das superfícies de resposta (Figura 2.6). A partir desses resultados foi possível estimar as condições para máxima produção de

xilanase: Temperatura de incubação de 25,55°C, umidade inicial de 60,55% e tempo de fermentação de 141,80h. Sob essas condições a resposta predita foi de 14,22 UI/g. A produção de xilanase predita foi confirmada e validada através da realização de um experimento (em triplicata) nas condições otimizadas, sendo encontrado um valor de 14,03 UI/g, que foi bastante próximo ao valor previsto. Utilizando o modelo em RCE, os determinantes encontrados foram: $\Delta_1 = - 0,450$; $\Delta_2 = 0,587$ e $\Delta_3 = - 1,677$; indicando também uma condição de máximo (Figura 2.7). Foi estimado um valor máximo de 6,52 UI/g sob as condições: temperatura de 24,95°C, umidade de 66,24% e tempo de fermentação de 126,24h. Foi encontrado um valor real de 6,24 UI/g, sendo considerado um valor muito próximo ao previsto pelo modelo. Modelos reduzidos já foram descritos com sucesso para a produção de xilanase (Santos et al., 2012), inclusive utilizando o planejamento Box-Behnken (Gowdhaman et al., 2014).

A produção de xilanase empregando a fermentação em estado sólido de resíduos agro-industriais tem sido amplamente investigada. Kaushik e colaboradores (2014) investigaram a produção de xilanasas utilizando o fungo *Aspergillus lentulus* e os substratos farelo de trigo (158,4 UI/g), sabugo de milho (153,0 UI/g), bagaço de cana-de-açúcar (129,9 UI/g) e palha de trigo (49,4 UI/g) umedecidos em meio mineral contendo extrato de levedura. Ang e colaboradores (2013) encontraram um valor de 418,70 UI/g utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* SK1 e tronco de palmeira-de-óleo, como substrato, umidificado com meio mineral contendo peptona e tween 80. Camassola e Dilon (2007) alcançaram um valor de 10 UI/g utilizando o fungo *P. echinulatum* sob fermentação em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e farelo de trigo umedecidos com meio mineral. É possível observar nos trabalhos citados que foram alcançados uma boa produção de xilanase. Entretanto, foram utilizados meio mineral e outros compostos para suplementação dos resíduos utilizados, o que pode gerar maiores custos de produção. Neste trabalho, foi utilizado apenas o resíduo de cajá como fonte de carbono, nitrogênio e energia.

Comparando os substratos investigados neste trabalho em relação a maior produtividade enzimática, pôde-se inferir que o substrato RC foi o mais adequado, sendo alcançado um valor máximo de atividade de xilanase 2,3 vezes maior para este resíduo. Uma possível explicação pode estar relacionada ao processo de extração realizado em RCE. Este processo pode ter ocasionado a perda de

nutrientes do resíduo por lixiviação, dificultando o desenvolvimento microbiano e resultando em uma menor produção enzimática.

2.4 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado foi possível obter xilanases de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob fermentação em estado sólido utilizando resíduos de cajá como única fonte de nutrientes e energia. O processo de extração com etanol realizado no resíduo de cajá resultou em efeitos negativos sobre a produção enzimática, sendo alcançados melhores resultados empregando-se o resíduo sem este tratamento.

A aplicação da metodologia de superfície de resposta utilizando uma matriz de planejamento Box-Behnken permitiu prever com êxito as condições das variáveis temperatura de incubação, umidade inicial e tempo de fermentação, necessárias para maximização da produção de xilanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 utilizando ambos os substratos investigados

2.5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, e a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

2.6 REFERÊNCIAS

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

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.

BAJPAI, P. Xylanases. In: SCHAECHTER, M., LEDERBERG, J. (Eds.), **Encyclopedia of Microbiology**, Third edition. Academic Press, San Diego, p. 600-612, 2009.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord). **Fundamentos. Biotecnologia Industrial**, v. 1. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, 254 p.

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 Biochemistry**, v. 45, p. 120-128, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugarcane bagasse and wheat bran on solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2196-2204, 2007.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588-1602, 2015.

CAVALCANTE, L. F.; DE LIMA, E. M.; DE OLIVEIRA FREIRE, J. L.; PEREIRA, W. E.; DA COSTA, A. D. P. M.; CAVALCANTE, Í. H. L. Componentes qualitativos do cajá em sete municípios do brejo paraibano. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2009.

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

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

FANG, T. J.; LIAO, B. C.; LEE, S. C. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. **New Biotechnol.**, v. 27, p. 25-32, 2010.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015. 190p.

GARAI, D.; KUMAR, V. A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 352-363, 2013.

GHOSE, T; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 591, p. 739-52, 1987.

GHOSHAL, G.; BANERJEE, U. C.; SHIVHARE, U. S. Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 1013-1024, 2015.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V. S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 90-98, 2014.

GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 535-541, 2008.

HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 1-18.

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

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KAPILAN, R.; ARASARATNAM, V. Paddy husk as support for solid state fermentation to produce xylanase from *Bacillus pumilus*. **Rice Science**, v. 18, p. 36-45, 2011.

KAR, S.; GAURI, S. S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUSHIK, P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 1-8, 2014.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 429-443, 2010.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51-57, 2009.

LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; XU, Y.; ZHAO, H. Application of statistical experimental design to optimize culture requirements of *Aspergillus* sp. zh-26 producing xylanase for degradation of arabinoxylans in mashing. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. 320-329, 2007.

MANDER, P.; CHOI, Y. H.; PRADEEP, G. C.; CHOI, Y. S.; HONG, J. H.; CHO, S. S.; YOO, J. C. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 451-456, 2014.

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

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; FIGUEIREDO, R. W. Processamento e utilização da polpa de cajá (*Spondias mombin* L.). **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, jul./dez. 2011.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, R. C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. Wiley, New York, 2002.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7563–7569, 2010.

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, p. 107-115, 2003.

PARK, Y. S. et al. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 761-766, 2002.

PERIČIN, D.; MADAREV-POPOVIC, S.; RADULOVI-POPOVIC, L.; SKRINJAR, M. Evaluate of pumpkin oil cake as substrate for the cellulase production by *Penicillium roqueforti* in solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 13, n. 4, p. 3815-3820, 2008.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DA SILVA DELABONA, P.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; NETO, V. B.; FARINAS, C. S. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SANTOS, T. C. D.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R. D.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222-233, jan/mar., 2016.

SANTOS-SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília, DF, 2009.

SHARMA, P., SINGH, L., DILBAGHI, N. Optimization of process variables for decolorization of disperse yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box–Beknken design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 1024-1029, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation: review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

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

SOUZA, F. X.; SOUSA, F. H. L.; FREITAS, J. B. S.; ROSSETTI, A. G. Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1 p. 215-220, 2000.

STEINBERG, D. M.; BURSZTYN, D. Response Surface Methodology in Biotechnology. **Quality Engineering**, v. 22, n. 2, p. 78-87, 2010.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 101-110, 2015.

CAPÍTULO 3

Propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizando um resíduo agro-industrial como substrato

Resumo: Este estudo objetivou investigar as propriedades cinéticas e o efeito da temperatura, pH, adição de íons metálicos e congelamento sobre a atividade de xilanases produzidas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido utilizando resíduo de cajá 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 xilanolítico bruto obtido a partir do meio fermentado após 150h de fermentação. Os parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX} foram determinados utilizando xilana de *beechwood* como substrato, sendo encontrado os valores de 1,06 mg/mL e 16,23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, respectivamente. Foi alcançada uma maior atividade de xilanase em pH na faixa de 3-5 e temperatura de 60°C durante a reação. As xilanases foram adequadamente estáveis em pH na faixa de 3-5 e temperaturas $\leq 60^\circ\text{C}$ após armazenamento por 5 h. A adição dos íons Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} e dos compostos Trolox e Triton X-100 ao extrato xilanolítico bruto resultou em aumento da atividade de xilanase, ao passo que as espécies Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e SDS comportaram-se como inibidores. O congelamento a -20 ou 4°C manteve mais de 94% da atividade enzimática após 120 dias incubação, indicando ser um procedimento promissor para o armazenamento destas enzimas.

Palavras-chave: Congelamento. Enzima. Estabilidade. Parâmetros cinéticos. pH. Temperatura.

Biochemical properties of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using an agro-industrial residue as substrate

Abstract: This study aimed to investigate the kinetic properties and the effect of temperature, pH, addition of metal ions and freeze on the activity of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation using yellow mombin residue and water as culture medium. The experiments were conducted in the Biotransformation and Organic Biocatalysis Laboratory, located at the State University of Santa Cruz – UESC. The assays were performed using the crude xyranolytic extract obtained from the fermented medium after a fermentation time of 150h. The kinetic parameters K_M and V_{MAX} were determined using beechwood xylan as substrate, being found the values of 1.06 mg/mL and 13.16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, respectively. It was achieved a higher activity of xylanase at pH in the range of 3-5 and a temperature of 60°C during the reaction. Xylanases were adequately stable at pH in the range of 3-5 and temperatures $\leq 60^\circ\text{C}$ after 5 h of incubation. The addition of ions Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} and compounds Trolox and Triton X-100 to the crude xyranolytic extract resulted in increased activity of

xylanase, whereas the species Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and SDS behaved as inhibitors. Freezing the -20 or 4°C maintained more than 94% of the enzyme activity after 120 days of incubation, indicating a promising procedure for storage of these enzymes.

Keywords: Enzyme. Freezing. Kinetic parameters. pH. Stability. Temperature.

3.1 INTRODUÇÃO

Xilanase é o nome genérico para um grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a despolimerização de xilanas. Fazem parte deste grupo as endoxilanases (EC 3.2.1.8), enzimas que clivam as ligações xilosídicas interiores de uma xilana para formar oligômeros de β -D-xilopiranosil, podendo formar também mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil; e as β -xilosidases (EC 3.2.1.37), as quais atuam clivando as ligações de terminais não redutores de pequenos xilo-oligossacarídeos e xilobiose liberando monômeros de β -D-xilopiranosil (Girio et al., 2010; Manimaran et al., 2009).

Nos últimos anos, a produção de xilanases tem-se tornado um foco de intensa pesquisa devido à possibilidade de aplicação como catalisadores ambientalmente favoráveis e seletivos em diversos processos de produção industrial, que incluem a manufatura de polpa e papel (branqueamento de polpa), produção de alimentos e bebidas (clarificação de sucos, panificação, fabricação de vinhos, extração de café, óleos de plantas e amido) e produção de xilo-oligossacarídeos com efeitos prebióticos (Goluguri et al., 2012; Bakri et al., 2008; Deutschmann e Dekker, 2012; Kamble & Jadhav, 2012).

A utilização de micro-organismos para a produção de xilanase tem recebido crescente atenção, principalmente, devido a sua disponibilidade, estabilidade estrutural e fácil manipulação genética, além de terem um significativo papel nas indústrias de alimentos, alimentação animal e polpa e papel (Irfan et al., 2016; Techapun et al., 2003). Entretanto, a produção de xilanase microbiana utilizando xilana pura como substrato é relativamente cara, uma vez que o custo do substrato soma cerca de 30% do custo total de produção de enzimas industriais (Mander et al., 2011).

As propriedades bioquímicas das xilanases também tem recebido especial atenção. Xilanases termoestáveis poderiam ser utilizadas em processos industriais onde exista a necessidade de manter uma temperatura mais elevada e onde uma

fase de arrefecimento não seria econômica, ao passo que xilanases acidófilas/alcalifílicas poderiam ser utilizadas onde um ajuste constante de pH a neutro não seria possível (Adhyaru et al., 2016). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar as características bioquímicas fundamentais de xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido quando utilizado resíduo de cajá e água como meio cultura.

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. Amostras de resíduo de cajá foram cedidas por uma fábrica de sucos e polpas de fruta localizada na cidade de Feira de Santana (Bahia, Brasil). Estas amostras foram secas ao Sol e em estufa (24h, 65°C), seguidas por trituração e peneiragem em malha de 1 mm.

3.2.2 Produção e extração de xilanase

Os ensaios de fermentação foram realizados em Erlenmeyers contendo 5 g de resíduo de cajá autoclavado e resfriado sendo adicionados água (até atingir uma umidade de 61%), e o inóculo (10^8 esporos/g de resíduo). Os cultivos foram conduzidos em ambiente de incubadora BOD, a 25°C, por 142 h. Após o processo fermentativo, os meios fermentados foram submetidos a uma extração utilizando solução tampão de citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), seguida por filtração e centrifugação, a 3000 rpm por 10 minutos. A parte sobrenadante, denominada extrato xilanolítico bruto, foi coletada e utilizada para os ensaios de atividade enzimática.

3.2.3 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de 1 mL de xilana de “beechwood” (Sigma[®]), na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído) em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Para o controle da reação foram incubados 1 mL de tampão citrato de sódio com 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído), enquanto que o branco de reação consistiu de 1 mL de tampão citrato de sódio e 1 mL da solução de xilana. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com base no método de Miller (1959), adicionando-se 2 mL de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) aos meios de reação seguido de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em água corrente de torneira. Após diluição com 6 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e convertida em atividade xilanásica a partir de uma curva padrão de xilose (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 xilanase foi realizada em meio padrão para determinação da atividade de xilanase (item 3.2.3), porém, utilizando-se diferentes temperaturas de incubação (40-90°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 xilanolítico bruto em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) sob diferentes temperaturas (50-80°C) por 5 h. Alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 h e submetidas à determinação da atividade de xilanase. 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 3 a 8. Para alcançar esses valores de pH foi necessário diluir o extrato enzimático bruto 10 vezes em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 3 a 5) e tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6 a 8). A atividade de xilanase 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 xilanolítico 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.

3.2.6 Efeito do congelamento

O extrato xilanolítico bruto foi armazenado congelado (4 e -20°C) por 120 dias em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) e a manutenção de sua atividade xilanolítica foi avaliada ao longo do tempo, com intervalo de 30 dias. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade obtida antes do congelamento.

3.2.7 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos $MgCl_2$, $Pb(C_2H_3O_2)_2$, $CaCO_3$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $Zn(C_2H_3O_2)_2$, $Al(NO_3)_3$, Na_2CO_3 e dos reagentes EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), SDS (dodecil sulfato de sódio), Triton X-100 (*t*-Octylphenoxy polyethoxyethanol) e Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) sobre a atividade enzimática. Os ensaios consistiram em incubar o extrato enzimático bruto em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) com os aditivos por 30 min seguido da determinação da atividade de xilanase. Todos os aditivos 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 xilanase obtida utilizando-se apenas o extrato enzimático bruto.

3.2.8 Estimativa dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten (K_m e $V_{Máx}$) foram estimados utilizando o extrato enzimático bruto contendo xilanase. O meio empregado e as condições de reação foram as mesmas aplicadas à determinação da atividade de xilanase exceto pelas concentrações do substrato xilana de “beechwood” (Sigma[®]) que variou entre 1 e 20 mg/mL. A constante de Michaelis-Menten (K_m , mg/mL) e a velocidade máxima de reação ($V_{Máx}$, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) 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

A temperatura influencia profundamente na atividade enzimática, sendo, portanto, essencial estudar os efeitos dessa variável sobre a atividade de xilanase. O efeito da temperatura foi avaliado para diferentes temperaturas conforme a Figura 3.1a, de onde pôde-se observar que a atividade relativa de xilanase aumentou com o aumento da temperatura de reação até alcançar um máximo em 60°C, sendo observado um declínio a partir desse valor. De acordo a Knob et al. (2013), a temperatura ótima de atividade de xilanase varia de acordo ao micro-organismo produtor. O mesmo autor encontrou uma temperatura ótima de 60°C utilizando xilanase do fungo *Penicillium glabrum*. Resultados similares foram encontrados por Kaushik et al. (2014) utilizando o fungo *Aspergillus lentulus*. Segundo Kulkarni e colaboradores (1999), temperaturas ótimas de xilanases de fungos podem variar entre 40 a 60°. Heinen et al. (2014) encontraram uma melhor temperatura de reação de 50°C para xilanase de *Fusarium heterosporum*. Knob e Carmona (2010) estudando o efeito da temperatura sobre a atividade de duas xilanases de *Penicillium sclerotiorum* encontram 50 e 55°C como temperaturas ótimas.

A termo-estabilidade de xilanases obtidas de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto na faixa de 50 a 80°C por 5h (Figura 3.1b). Os resultados indicaram excelente estabilidade nas temperaturas de 50 e 60°C, sendo mantidas cerca de 100 e 96% da atividade, respectivamente, após 5 h de incubação. Sob as condições de temperatura de 70 e 80°C, foi observado um

declínio acentuado quando comparado com as temperaturas inferiores investigadas. Entretanto, as enzimas mantiveram cerca de 80 e 65% das atividades para as temperaturas de 70 e 80°C, respectivamente, após 5 h de incubação.

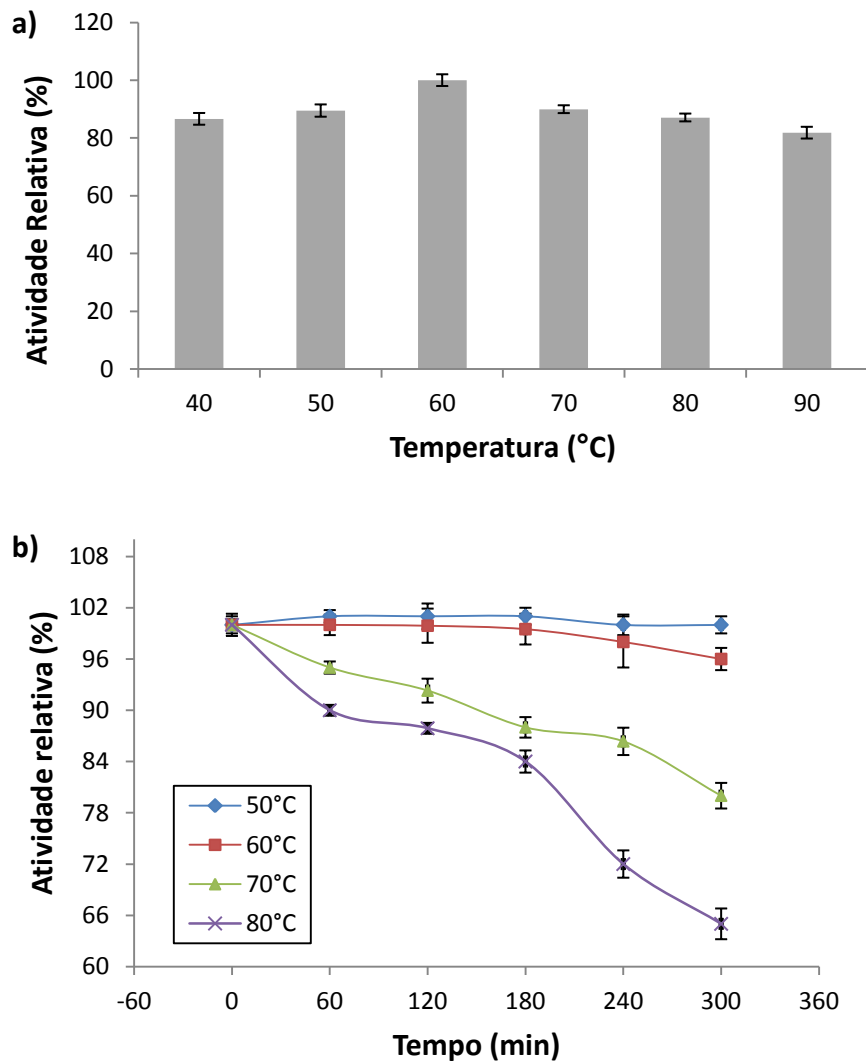


Figura 3.1 - (a) Atividade de xilanase obtida em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 60 °C foi tomada como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). **(b)** Perfil de termoestabilidade de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0 h foi tomada como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

Terrasan e colaboradores (2013), avaliando a termo-estabilidade de xilanase de *Penicillium janczewskii* observaram um tempo de 15 min para a enzima atingir a metade da atividade inicial a 50 °C, ao passo que em 60 °C esse valor foi de 3 min. Lee et al. (2015), investigando a termoestabilidade de xilanase de *Penicillium rolsfii* c3-2(1) IBRL notaram uma atividade relativa acima de 83% quando as enzimas

foram incubadas nas temperatura de 50 e 55°C por 250 min. Entretanto, em temperaturas de 60 e 65°C foi observado um decaimento abaixo de 50% em tempos de incubação de 50 e 20 min, respectivamente.

Os resultados alcançados neste trabalho permitiram inferir que as xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentaram boa estabilidade nas temperaturas investigadas, sugerindo a presença de moléculas protetoras, no extrato enzimático bruto, as quais podem ter contribuído com interações intermoleculares necessárias para manter a integridade estrutural das xilanases estudadas frente às diferentes temperaturas.

3.3.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade

O efeito do pH sobre a atividade de xilanase obtida de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi verificado na faixa de 3 a 8 (Figura 3.2a). Máxima atividade enzimática foi observada no pH 3, não havendo diferença acentuada na faixa de 3 a 5. A atividade declinou cerca de 40% em valores de pH a partir de 6. Melhores atividades em pH ácidos sugeriu tratar-se de xilanases acidófilas.

De acordo a Murthy e Naidu (2012), muitos estudos têm indicado que a maioria das xilanases fúngicas exibem melhor atividade em pH entre 3,5 e 5. Lee et al. (2009) também relataram que xilanases derivadas de fungos, normalmente, apresentam mais alta atividade em condições ácidas.

Lafond et al (2011) investigaram a influencia do pH sobre a atividade de xilinasas obtidas de *P. funiculosum* e encontraram uma faixa ótima entre 4 e 5,5. Knob e Carmona (2008) avaliaram o efeito do pH sobre a atividade de xilanase obtida de *P. sclerotiorum*, sendo encontrado um máximo resultado em pH 4,5.

A estabilidade ao pH foi avaliada na faixa de 3 a 8 (Figura 3.2b). Melhor estabilidade foi alcançada utilizando pH ácidos (pH 3, 4 e 5), sendo a atividade enzimática mantida acima de 90% após 5 h de incubação a 50 °C. Em pH 6, 7 e 8, foram mantidas cerca de 66, 68 e 71% da atividade enzimática, respectivamente, após o tempo máximo de incubação investigado. Resultados similares foram encontrados por Knob et al (2013) utilizando xilnase de *Penicillium glabrum*, sendo apontado uma melhor estabilidade na faixa de pH de 2,5 a 5. De acordo com Kulkarni et al. (1999), normalmente as xilanases produzidas por fungos são estáveis

na faixa de pH de 3,0 a 10,0, fato que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

A ótima atividade e estabilidade em condições de pH ácidos torna o uso das xilanases obtidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 atraentes para algumas aplicações industriais, tais como na indústria de polpa e papel bem como na indústria de alimentação humana e animal (Knob e Carmona, 2008; Knob e Carmona, 2010).

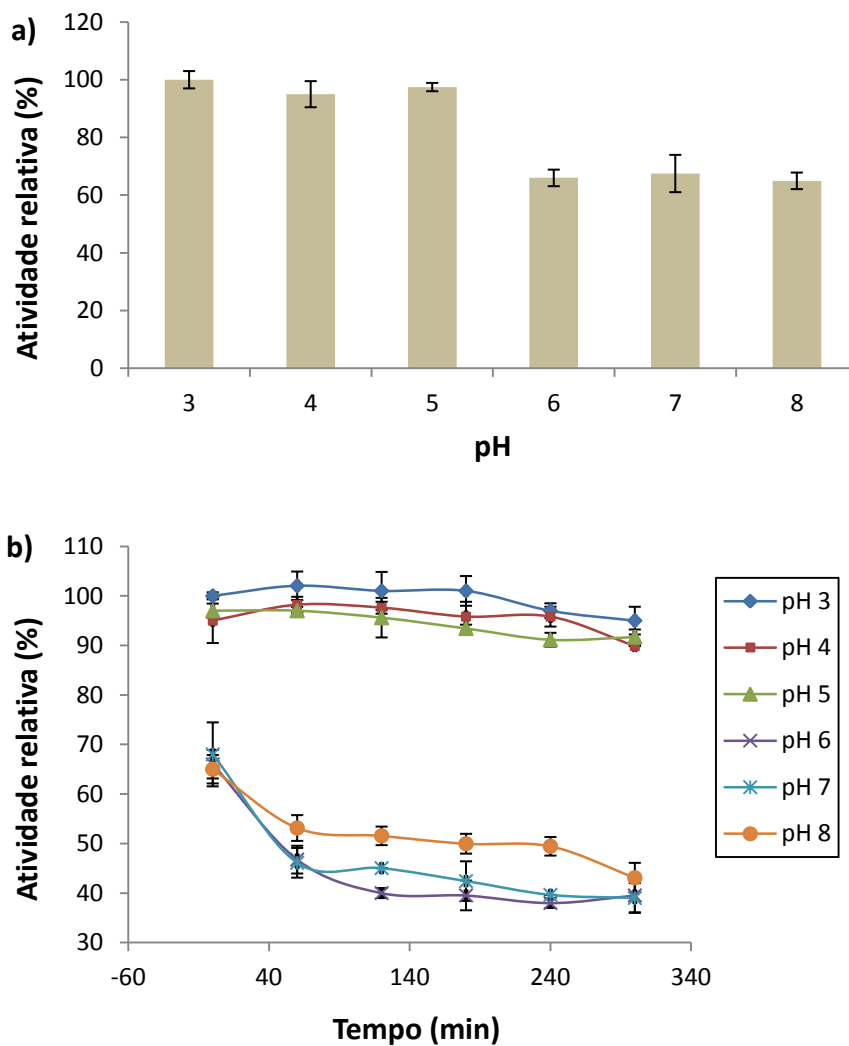


Figura 3.2 - (a) Atividade de xilanase obtida em diferentes pH (a mais alta atividade obtida em pH 3 foi tomada como 100%; condições de reação: temperatura: 50 °C, tempo 10 min). **(b)** Perfil de estabilidade ao pH de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0 h em pH 3 foi tomada como 100%; condições de reação: temperatura: 50 °C; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

3.3.3 Efeito do congelamento

Segundo Heller et al. (1997), o congelamento à baixas temperaturas é o método mais comum de armazenamento de proteínas. Entretanto, o congelamento de soluções enzimáticas pode causar modificações estruturais ('stress' enzimático) ocasionando a perda ou diminuição da atividade catalítica, provocado pela formação de cristais de gelo. Visando avaliar o efeito do armazenamento em baixas temperaturas, o extrato enzimático bruto foi submetido às temperaturas de -20 e 4°C, sendo tomadas alíquotas em intervalos de 30 dias para verificação da atividade de xilanase (Figura 3.3).

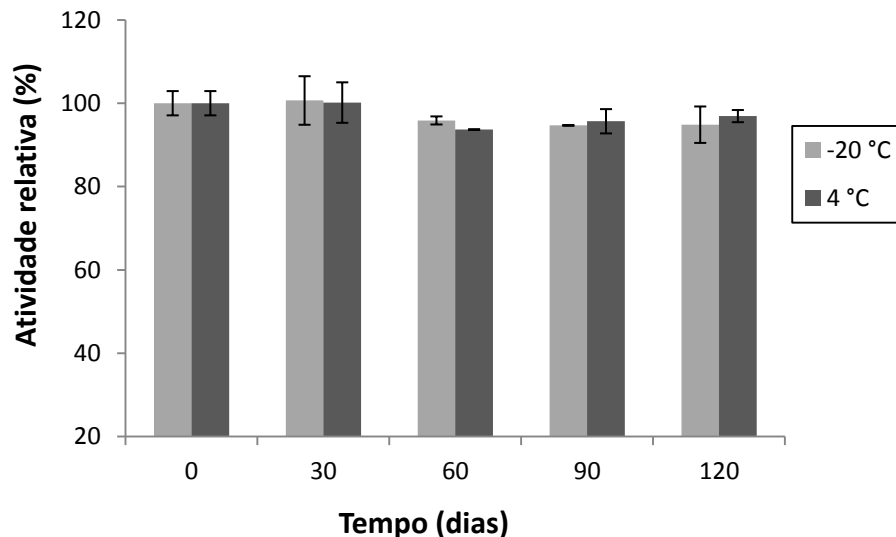


Figura 3.3 - Efeito do congelamento do extrato enzimático bruto a -20°C e 4°C sobre atividade de xilanase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES quando cultivado em resíduo de cajá (a atividade obtida no tempo 0h foi tomada como 100%; o extrato enzimático bruto foi obtido utilizando tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8; condições de reação: temperatura: 50°C, pH: 4,8, tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

Os resultados demonstraram que as xilanases mantiveram-se estáveis em ambas as temperaturas investigadas após 120 dias de congelamento, sendo mantidas cerca de 94 e 96% da atividade após o congelamento em -20° e 4°C, respectivamente. Além disso, no intervalo de tempo de 30 dias foi observado um leve aumento na atividade das xilanases, Esse comportamento pode ser explicado pela mudança estrutural das proteínas. O congelamento interfere na atividade de água e ocasiona reestruturação das cadeias peptídicas, podendo deixar o sítio

catalítico mais disponível resultando em um aumento de atividade enzimática (Santos et al., 2016).

Aguiar e Lucena (2011), investigando a estabilidade ao congelamento de enzimas celulolíticas obtidas de *Aspergillus niger* demonstraram que não houve perda acentuada de atividade quando as enzimas foram armazenadas a -18°C por um período de 43 dias. Entretanto, a 4°C , a atividade reduziu cerca de 40% após 48 h de armazenamento. Santos et al. (2016) também observaram comportamento semelhante para enzimas celulolíticas de *A. niger* indicando uma mais baixa temperatura como melhor condição para o armazenamento dessa enzimas. Por outro lado, não houve diferença significativa quando xilanases de *P. roqueforti* obtidas neste trabalho foram armazenadas nas temperaturas de -20 e 4°C , sendo possível apontar o congelamento do extrato enzimático bruto em ambas as temperaturas como uma forma de manter as enzimas ativas por um maior período de tempo.

3.3.4 Efeito da presença de íons metálicos e compostos orgânicos

Os resultados do efeito de diferentes íons metálico e outros compostos sobre a atividade de xilanase estão representados na Tabela 3.1. Dentre os nove íons metálicos investigados cinco apresentaram efeitos positivos. O íon Mn^{2+} foi a espécie que exerceu maior efeito, aumentado cerca de 40% da atividade. As espécies Al^{3+} , Zn^{2+} , Na^{+} e Ca^{2+} aumentaram a atividade em cerca de 23, 11, 9 e 4%, respectivamente. A presença do íon Co^{2+} não modificou acentuadamente a atividade de xilanase, ao passo que as espécies Mg^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} comportaram-se como inibidores. A presença de Cu^{2+} reduziu a atividade a cerca de 51%, apresentando o maior efeito inibidor. Conn e Stumpf (1987) relataram que cerca de um terço das enzimas apresentam metais em sua composição ou necessitam de metais como cofatores. 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.

Moreira et al. (2013) e Vasconcellos et al. (2016), também demonstraram que o íon Mn^{2+} apresentou um alto efeito ativador em duas β -xilanases obtidas de *Aspergillus terreus* e em xilanase de *Aspergillus niger*, respectivamente. Querido et al. (2006) mostrou que Al^{3+} aumentou a atividade de xilanase de *P. expansum*. Ghoshal et al. (2015), relataram um aumentado de atividade de xilanase de *Penicillium citrinum* MTCC 9620 na presença de Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , ao passo que Ca^{2+} , Cu^{2+} exerceram efeitos negativos. Por outro lado, xilanases de *Fusarium heterosporum* foi ativada por Ca^{2+} e Mg^{2+} e fortemente inibida por Pb^{2+} e Zn^{2+} (Heinen et al., 2014). Zhang et al (2007) também apontou Cu^{2+} como forte inibidor de xilanases. No trabalho de Terrasan e colaboradores (2016), Na^+ também apresentou efeito ativador para uma xilanase de *Penicillium janczewskii*.

Tabela 3.1 - Atividade de xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato xilanolítico bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2 mM; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados entre parênteses indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

| | Atividade Relativa (%) |
|--|------------------------|
| Controle | 100 ± 2,3 |
| MgCl ₂ | 84 ± 1,8 |
| Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | 75 ± 1,8 |
| CaCO ₃ | 104 ± 0,9 |
| MnSO ₄ | 141 ± 23,5 |
| CoCl ₂ | 101 ± 6,0 |
| CuSO ₄ | 51 ± 7,4 |
| Zn(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ | 111 ± 0,0 |
| Al(NO ₃) ₃ | 123 ± 5,5 |
| Na ₂ CO ₃ | 109 ± 2,2 |
| EDTA | 95 ± 10,2 |
| SDS | 57 ± 10,9 |
| Triton-X | 134 ± 4,18 |
| Trolox | 259 ± 5,0 |

Dentre os compostos orgânicos investigados, Trolox comportou-se como um potente ativador aumentando a atividade catalítica em cerca de 159%. Este composto apresenta atividade antioxidante, o que sugeriu um efeito protetor para com as xilanases estudadas, evitando, possivelmente, a oxidação de grupos das enzimas e permitindo a manutenção de sua forma ativa. A presença de Triton X também resultou em aumento da atividade catalítica. Por outro lado, SDS apresentou um efeito inibidor, resultando em diminuição de cerca de 43% da atividade enzimática, ao passo que a presença de EDTA não afetou acentuadamente a atividade xilanásica. A influência de Triton X e SDS indicam que a existência de interações hidrofóbicas pode ser importante na manutenção da estrutura da xilanase obtida. Resultados similares foram divulgados utilizando xilanase recombinante de *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu et al., 2006). SDS também tem sido apontado como forte inibidor de xilanases de *Aspergillus nidulans* e *Penicillium glabrum* (Maitan-Alfenas et al., 2016; Knob et al., 2013).

3.3.5 Estimativa dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de xilanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 foram estimados utilizando-se o método de linearização de Lineweaver e Burk (1934) tendo como substrato a xilana de *beechwood*. O perfil cinético é apresentado na Figura 3.4, de onde pôde-se inferir que a xilanase apresentou um comportamento linear típico de uma enzima Michaeliana. Os respectivos valores de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ encontrados foram 1,06 mg/mL e 16,23 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$. Estes resultados estão em concordância com os valores encontrados de outras xilanases fúngicas relatadas por Beg et al. (2001), onde os valores de K_m variaram de 0,15 a 49,5 mg/mL e $V_{M\acute{a}x}$ de 5,73 a 691,6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

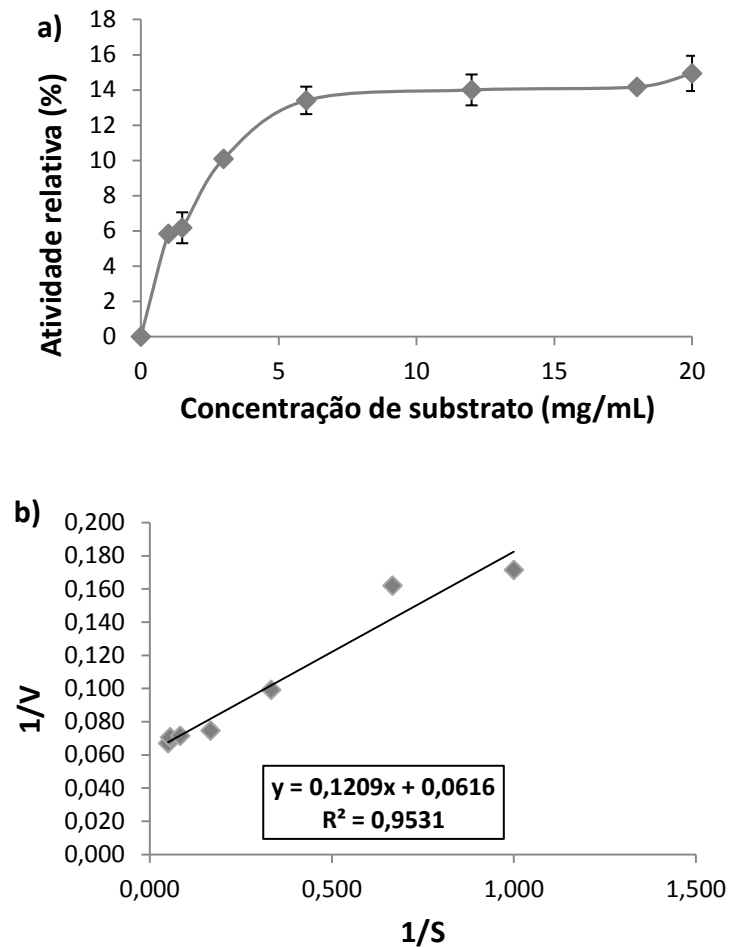


Figura 3.4 - (a) Efeito da concentração de substrato sobre a atividade de xilanase produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES sobre resíduo de cajá. **(b)** Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{Máx}$ (condições de reação: substrato utilizado: xilana *beechwood*; faixa de concentração: 1-20 mg/mL; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

3.4 CONCLUSÃO

Xilanases produzidas por *P. roqueforti* ATCC 10110 apresentaram muitas características similares a outras xilanases relatadas na literatura, destacando-se, entretanto, pela alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, ativação frente a muitos íons metálicos, Triton X e Trolox, e estabilidade ao congelamento a 4°C por um longo período de tempo sem a necessidade de adição de agentes estabilizantes.

3.5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, e a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

3.6 REFERÊNCIAS

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51-57, 2016.

AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

BAKRI, Y.; AL-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus niger* SS7 in submerged culture. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 249-251, 2008.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. Editora Edgard Blücher Ltda, 1987.

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627-1640, 2012.

GHOSHAL, G.; BANERJEE, U. C.; SHIVHARE, U. S. Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 1013-1024, 2015.

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

GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; CHERUPALLY, M.; NIDADAVOLU, N.; MANGAMURI, L. N.; ADDEPALLY, U. Potential of thermo and alkali stable xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in biobleaching of wood Kraft pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p.2369–2380, 2012.

HEINEN, P. R.; HENN, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; SIMÃO, R. D. C. G.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; POLIZELI, M. L. T. M.; KADOWAKI, M. K. Xylanase from *Fusarium heterosporum*: Properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 9, p. 1047-1055, 2014.

HELLER, M. C.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. **Biotechnology progress**, v. 13, n. 5, p. 590-596, 1997.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, v. 9, p. 139-147, 2016.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *bacillus* in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

KAR, S.; GAURI, S. S.; DAS, A.; JANA, A.; MAITY, C.; MANDAL, A.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 57-68, 2013.

KAUSHIK, P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 1-8, 2014.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. D. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 429-443, 2010.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. **World Applied Sciences Journal**, v. 4, p. 277-283, 2008.

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

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E. H.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 20., 2011.

LEE, J-W.; PARK, J-Y.; KWON, M.; CHOI, I-G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LEE, K. C.; ARAI, T.; IBRAHIM, D.; PRAWITWONG, P.; DENG, L.; MURATA, Y.; MORI, Y.; KOSUGI, A. Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolsii* c3-2(1) IBRL. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1627-1643, 2015.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60-67, 2016.

MANDER, P.; CHO, S. S.; SIMKHADA, J. R.; CHOI, Y. H.; YOO, J. C. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1449-1455, 2011.

MANIMARAN, A.; KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 887-893, 2009.

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

MOREIRA, L. R. S.; CAMPOS, M. C.; SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FERREIRA FILHO, E. X. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

QUERIDO, A. L. D. S.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F. D.; CHAVES-ALVES, V. M. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 475-480, 2006.

SANTOS, T. C. D.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R. D.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222-233, jan/mar., 2016.

SCOPES, R. K. **Protein purification**: principles and practice. 3a ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes

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

TERRASAN, C. R.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA JUNIOR, F. G.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, Physico-chemical Properties, and Application of the Crude Extract to Pulp Biobleaching. **BioResources**, v. 8, n. 1, 2013.

TERRASAN, C. R. F.; GUIBAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 54-62, 2016.

WU, S.; LIU, B.; ZHANG, X. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1210-1216, 2006.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 101-110, 2015.

CAPÍTULO 4

Sacarificação de agroresíduos utilizando xilanase bruta produzida por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110

Resumo: A sacarificação de resíduos lignocelulósicos tem sido apontada como alternativa atraente para o reaproveitamento e agregação de valor a estes materiais. No presente estudo, foi avaliada a utilização de xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 visando a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, sabugo de milho e casca de arroz. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica, localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Todos os resíduos foram suscetíveis à sacarificação enzimática. Maior rendimento de açúcares redutores (259,45 mg/g) foi alcançado quando utilizado bagaço de cana-de-açúcar como substrato após 4h de reação. A hidrólise de sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim resultou na produção de 180,22 mg/g, 137,70 mg/g e 128,48 mg/g, respectivamente. A adição de Mn^{2+} (10 mmol/L de meio reacional) potencializou o processo de sacarificação de bagaço de cana de açúcar aumentado cerca de 86% o rendimento de açúcares redutores. Os parâmetros temperatura e carga de substrato foram otimizados utilizando o planejamento Doehlert. Máxima produção de açúcar (662,34 mg/g) foi alcançada mantendo a temperatura em 62,40°C e carga de substrato de 0,22%. O rendimento de açúcares foi significativamente alto quando comparado com estudos anteriores disponíveis na literatura o que sugere a utilização de xilanase bruta adicionada de Mn^{2+} um processo alternativo e promissor para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Otimização. Planejamento Doehlert. Suplementação com Mn^{2+} . Xilanase bruta.

Saccharification of agroresidues using crude xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110

Abstract: The saccharification of lignocellulosic residues has been pointed to as attractive alternative for the reuse and aggregation of value to these materials. In this study, was evaluated the use of crude xylanase produced by *P. roqueforti* ATCC 10110 aiming the saccharification of sugarcane bagasse, peanut shells, corn cob and rice husk. All the experiments were performed in the Biotransformation and Organic Biocatalysis Laboratory, located at the State University of Santa Cruz – UESC. All the residues were susceptible to enzymatic saccharification. Better yield of reducing sugars (259.45 mg/g) was achieved when using sugarcane bagasse as the substrate after 4 h of reaction. The hydrolysis of corn cob, rice husk and peanut shells resulted in the production of 180.22 mg/g, 137.70 mg/g and 128.48 mg/g, respectively. The addition of Mn^{2+} (10 mmol/L of reaction medium) potentiated the saccharification

process of sugarcane bagasse, increasing the yield of reducing sugars by about 86%. The parameters temperature and substrate load were optimized using Doehlert design. Maximum sugar yield (662.34 mg/g) was achieved by maintaining the temperature at 62.40°C and substrate load of 0.22%. The sugar yield was significantly high when compared to previous studies available in the literature, suggesting the use of crude xylanase added Mn^{2+} an alternative and promising process for sugarcane bagasse saccharification.

Keywords: Crude xylanase. Doehlert design. Enzymatic hydrolysis. Optimization. Supplementation with Mn^{2+} .

4.1 INTRODUÇÃO

A preocupação com os problemas relacionados com a geração de resíduos agro-industriais, principalmente a escassez de locais para a sua eliminação e poluição ambiental causado por sua disposição, associado com a possibilidade de sua utilização como matérias-primas para conversão em diferentes produtos de valor agregado (aditivos alimentares, nutracêuticos, enzimas e combustíveis), têm indicado a reciclagem desses materiais como uma atividade econômica válida (Anwar et al., 2014; El-Bakry et al., 2015).

A maioria dos agrosresíduos são ricos em polissacarídeos (celulose e hemicelulose) que os tornam matérias-primas potencialmente úteis para produção de açúcares fermentáveis que podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração (Avci et al., 2013). Atualmente, a fração celulósica dos materiais lignocelulósicos é a principal parte investigada para a produção de açúcares fermentáveis, ao passo que a fração hemicelulósica, que também pode formar açúcares, ainda está a ser aproveitada (Kumar et al., 2012).

Xilana é o principal componente da hemicelulose e o processo de sacarificação deste material pode ser realizado por uma variedade de métodos (hidrólise térmica, ácida, alcalina ou enzimática). A hidrólise enzimática é um dos métodos que oferece diversas vantagens, como alta especificidade, condições de reação mais suave, alto rendimento e menor formação de produtos indesejáveis (Sadaf e Khare, 2014; Chapla et al., 2010). A completa hidrólise da xilana requer a participação de várias enzimas, que incluem as endoxilanases (EC 3.2.1.8), as β -xilosidases (EC 3.2.1.37) e enzimas acessórias tais como acetil xilana esterase (EC 3.1.1.16), α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glicuronidase (EC 3.2.1.131), ácido

p-cumárico esterase (E.C.3.1.1.-) e ácido ferúlico esterase (E.C.3.1.1.73), necessárias para a desramificação de grupos laterais ligados à cadeia principal de xilanas substituídas (Kocabas et al., 2015).

A presença da xilana em biomassa lignocelulódica geralmente ocorre como complexo lignina-xilana, o que torna a biomassa resistente à hidrólise enzimática (Chapla et al., 2012). Além disso, a adsorção não produtiva das enzimas à lignina também prejudica a hidrólise (Ko et al., 2015). Dessa forma, processos de pretratamento têm sido sugeridos para sacarificação eficiente desses materiais (Hongdan et al., 2013; Pensupa et al., 2013). Entretanto, essas estratégias acrescentam custos consideráveis ao processo.

Uma possível estratégia para a hidrólise eficiente de biomassa lignocelulósica é a utilização de coquetéis enzimáticos ou preparo enzimático bruto adicionado de íons metálicos específicos. Preparos enzimáticos apresentam vantagens por conter diversas enzimas hidrolíticas necessárias para completa hidrólise da biomassa (Garai e Kumar et al., 2013), ao passo que a utilização de alguns íons metálicos pode reduzir a adsorção não produtiva das enzimas na lignina através da formação de complexos metal-lignina (Vasconcellos et al., 2016). Além disso, é desejável que as enzimas possuam baixo custo de produção e sejam estáveis em uma ampla faixa de temperatura e pH (Maitan-Alfenas et al., 2016).

No capítulo anterior (Capítulo 3), nós demonstramos que xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110, quando cultivado apenas em resíduo de cajá e água, apresentou alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (3 a 8) e temperatura (50 a 80°C), e ativação (aumento de cerca de 40% da atividade) frente a presença do íon Mn^{2+} . Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de xilanase bruta de *P. roqueforti* ATCC 10110 na sacarificação de resíduos de origem agro-industrial (bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, sabugo de milho e casca de arroz) e adicionalmente investigar o efeito da temperatura, pH e da adição de Mn^{2+} sobre a sacarificação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Micro-organismo

A cepa de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizada neste estudo foi adquirida do INCQS/Fiocruz (Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), podendo ser consultada pelo código 40074. A cepa foi mantida a 4°C em meio de cultura ágar-dextrose-batata (PDA). A suspensão de esporos foi preparada utilizando-se o micro-organismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 25°C. Após o período de incubação, a cultura esporulada foi suspensa em solução Tween 80 (0,01%, v/v), sendo a contagem do número de esporos realizada em microscópio binocular utilizando câmara de Neubauer.

4.2.2 Resíduos lignocelulósicos

Resíduos de cajá e de arroz foram obtidos de agro-indústrias de processamento de frutas e de beneficiamento de arroz localizadas na região sul e oeste do estado da Bahia (Brasil), respectivamente. Bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim e sabugo de milho foram adquiridos em feira livre na cidade de Itabuna (Bahia, Brasil). Todos os resíduos foram secos em estufa (24h, 65°C), seguidos por trituração e peneiragem em malha de 1 mm.

4.2.3 Produção de xilanase bruta

A produção enzimática foi realizada por fermentação em estado sólido utilizando frascos Erlenmeyers contendo 5g de resíduo de cajá autoclavado e resfriado. Aos frascos foram adicionadas água (umidade 61%) e inóculo (10^8 esporos/g de resíduo seco). Os cultivos foram conduzidos em ambiente de incubadora BOD, a 25°C, por 150 h. Os meios fermentados foram submetidos a uma extração utilizando tampão de citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), seguido por filtração e centrifugação, a 3000 rpm por 10 minutos. A parte sobrenadante, denominada xilanase bruta, foi coletada e utilizada para os ensaios de atividade xilanásica e sacarificação de agrosídeos.

4.2.4 Determinação da atividade xilanásica

Os ensaios de atividade de xilanase foram conduzidos com base em procedimentos padrão recomendados pela IUPAC (Ghose e Bisaria, 1987). A

mistura reacional contendo 1 mL de xilana de “*beechnwood*” (Sigma®), na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), e 1 mL do extrato enzimático bruto (previamente diluído) foi incubada em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A quantidade de açúcares redutores liberada foi quantificada com base no método de Miller (1959) e utilizando uma curva padrão de xilose (0 a 1 $\mu\text{mol/mL}$). 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.

4.2.5 Sacarificação de agroresíduos

A xilanase bruta (extrato enzimático bruto) produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 foi utilizada para sacarificar bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim, sabugo de milho e casca de arroz. O meio de reação consistiu de 20 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) contendo 1% de resíduo, xilanase bruta (130 UI/g de resíduo seco) e 0,005% de azida de sódio para prevenir contaminação. A sacarificação foi realizada em agitador orbital a 50°C por 6 h, sendo retiradas alíquotas em intervalos de 2 h. O controle de cada mistura reacional foi realizado sem a utilização da xilanase bruta. Após a sacarificação, a parte sobrenadante foi utilizada para estimar a quantidade de açúcares redutores liberados (Miller, 1959) com base em uma curva padrão de xilose (0 a 1 $\mu\text{mol/mL}$).

4.2.6 Efeito de Mn^{2+} sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

O efeito de Mn^{2+} sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado nas concentrações de 2 e 10 mmol/L de meio de reação. O procedimento consistiu em adicionar MnSO_4 ao meio padrão de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar sendo a quantidade de açúcares redutores liberados quantificada após 4 h de reação.

4.2.7 Planejamento Doehlert para otimização da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado uma matriz de planejamento Doehlert para avaliar a influência dos parâmetros temperatura (°C) e carga de substrato (% m/v) sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e também determinar os níveis mais adequados dessas variáveis para alcançar o máximo rendimento de sacarificação. A matriz consistiu de 9 experimentos, incluído de três réplicas no ponto central para estimar o erro experimental, avaliar efeitos quadráticos, lineares e de interação das variáveis e para ajustar um modelo matemático de segunda ordem. A quantidade de açúcares redutores formados (mg/g de resíduo de cana) foi escolhida como valor de resposta e os fatores temperatura (T) e carga de substrato (CS) foram selecionados como variáveis independentes. Os valores reais e codificados das variáveis independentes podem ser observados nas Tabelas 4.1.

Tabela 4.1 - Variáveis e níveis do planejamento Doehlert para a otimização da sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido sob resíduo de cajá.

| Variável | Símbolo | Níveis | | | | | | |
|------------------------|---------|--------|--------|------|-----|------|--------|----|
| | | -1 | -0,866 | -0,5 | 0 | +0,5 | +0,866 | +1 |
| Temperatura (°C) | T | | 40 | | 60 | | 80 | |
| Carga de substrato (%) | CS | 0,2 | | 0,65 | 1,1 | 1,55 | | 2 |

A partir dos valores experimentais obtidos como resposta, foi construído um modelo polinomial de segunda ordem de acordo com a equação 4.1 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.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1+1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (4.1)$$

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 versão 10 (STATSOFT) para análise dos dados e elaboração dos gráficos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de resíduo de cajá como substrato para produção de enzimas por *P. roqueforti* ATCC 10110 em FES resultou na obtenção de um extrato enzimático bruto rico em xilanase, apresentando 14 UI/g de resíduo de cajá de atividade xilanásica. Este extrato enzimático, denominado xilanase bruta, foi utilizado visando à sacarificação de biomassa lignocelulósica.

4.3.1 Sacarificação de agrosíduos

A sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim empregando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 foi realizada em diferentes intervalos de tempo e os resultados podem ser observados na Figura 4.1. Estes resultados indicaram que todos os resíduos foram suscetíveis à hidrólise enzimática, o que pode estar relacionado à alta concentração de hemicelulose nestes materiais (Garai e Kumar, 2013; Fang et al., 2007). Outro fator que pode ter contribuído foi a utilização de extrato enzimático bruto (xilanase bruta) ao invés da enzima purificada. O sinergismo entre xilanases e outras enzimas pode ter facilitado a sacarificação dos agrosíduos. Bagaço de cana-de-açúcar foi considerado o melhor candidato para sacarificação, sendo alcançado uma maior produção de açúcares redutores (259,45 mg/g) em 4h de reação. Após este período não houve diferença significativa no rendimento da sacarificação. A sacarificação de sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim resultou na produção de 180,22 mg/g, 137,70 mg/g e 128,48mg/g, respectivamente.

A sacarificação enzimática de resíduos agro-industriais para obtenção de açúcares é de grande interesse para a indústria de biotecnologia atual, particularmente para a produção de bio-etanol. O principal interesse na utilização da hidrólise enzimática são as vantagens apresentadas, podendo-se destacar o alto

rendimento, condições de reação mais suave, menor gasto de energia e menor formação de produtos indesejáveis (Sadaf e Khare, 2014; Vicuna et al., 1995). A utilização de xilanase bruta para sacarificação de materiais lignocelulósicos tem sido relatada na literatura. Garai e Kumar (2013) demonstrou eficiente sacarificação de sabugo de milho, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar quando utilizado xilanase bruta produzida por *Aspergillus candidus*. Chapla e colaboradores (2010) também relataram a hidrólise eficiente de agroresíduos utilizando xilanase bruta de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898. Entretanto, vale ressaltar que nos estudos citados os agroresíduos utilizados foram submetidos a processos de pré-tratamento físico-químicos antes da hidrólise enzimática. Etapas de pré-tratamento normalmente facilitam o acesso da enzima ao substrato, mas somam custos ao processo podendo torná-lo desvantajoso. Neste trabalho, a aplicação de xilanase bruta de *P. roqueforti* ATCC 10110 resultou em eficiente sacarificação de agroresíduos sem a utilização de etapas de pré-tratamento. Adhyaru e colaboradores (2016) relataram a possibilidade de sacarificação de palha de sorgo, palha de trigo, palha de arroz, palha de cevada e sabugo de milho não tratado utilizando xilanase bruta produzida por *Aspergillus tubingensis* FDHN1. Mohana e colaboradores (2008) relataram a utilização de xilanase bruta de *Burkholderia* sp. DMAX na hidrólise de farelo de trigo não tratado.

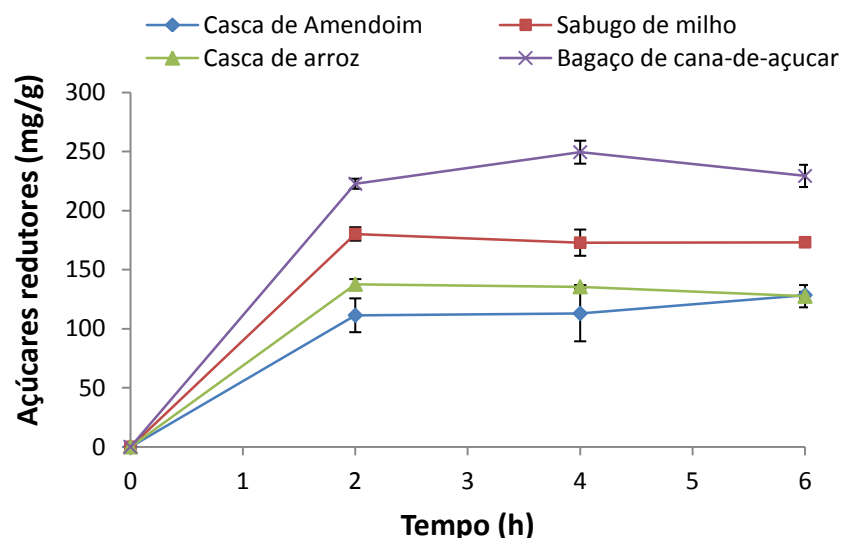


Figura 4.1 - Sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim empregando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 6 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

4.3.2 Efeito de Mn^{2+} sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

Alguns íons metálicos têm sido apontados como aditivos capazes de melhorar a sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos. No presente estudo, foi investigada a adição de Mn^{2+} ao meio reacional de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar por xilanase bruta produzida por *P. roqueforti*. O efeito de duas diferentes concentrações de Mn^{2+} , 2 e 10 mmol/L, pode ser observado na Figura 4.2.

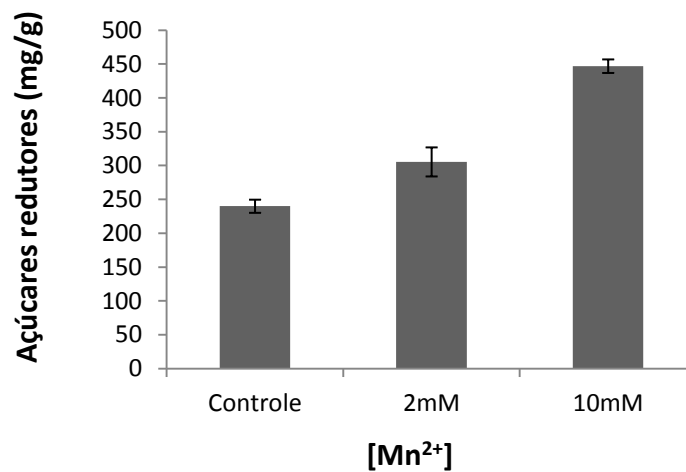


Figura 4.2 - Efeito de Mn^{2+} sobre a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar por xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 4 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

A partir da Figura 4.2, pôde-se observar que a adição de Mn^{2+} favoreceu o processo de sacarificação resultando em maior produção de açúcares redutores quando comparado com a utilização de xilanase bruta sem a adição de Mn^{2+} (controle). Utilizando uma concentração de 10 mmol/L foi alcançada uma produção de 446,98 mg/g, um aumento de 86% na formação de açúcares redutores, ao passo que utilizando uma concentração de 2 mmol/L foi produzido 305,51 mg/g, um aumento de cerca de 27%. Resultados similares foram encontrados por Vasconcellos e colaboradores (2016) utilizando extrato enzimático bruto (hemi)celulolítico para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. A melhor sacarificação enzimática de biomassa lignocelulósica quando adicionado de alguns íons metálicos está associado à redução da adsorção de enzimas à lignina, através da formação de complexos metal-lignina, e ao aumento da atividade de algumas

enzimas frente a determinados íons metálicos. O sítio ativo de uma enzima possui grupos de aminoácidos que podem reagir com compostos metálicos resultando em alteração da atividade catalítica. Moreira et al. (2013) e Ghoshal et al. (2015) também demonstraram que o íon Mn^{2+} apresentou um alto efeito ativador em duas β -xilanases obtidas de *Aspergillus terreus* e em xilanase de *Penicillium citrinum* MTCC 9620.

4.2.7 Planejamento Doehlert para otimização do processo de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

Temperatura (T) e carga de substrato (CS) são duas variáveis que podem influenciar profundamente a catálise enzimática. Assim, foi desenvolvido um planejamento Doehlert visando avaliar a influência destas variáveis e otimizar o rendimento de açúcares redutores liberados durante a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A matriz do planejamento experimental e o correspondente rendimento de açúcares redutores (mg/g de bagaço de cana-de-açúcar) foram mostrados na Tabela 4.2. Os dados disponíveis nesta tabela foram submetidos à análise de regressão para construção de um modelo matemático de previsão.

Tabela 4.2 - Matriz do tipo Doehlert para análise dos parâmetros temperatura (T, °C) e carga de substrato (CS, %) e otimização da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110.

| Experimento | T | CS | Açúcares redutores (mg/g) |
|-------------|------|--------|---------------------------|
| 1 | +1 | 0 | 233,88 |
| 2 | +0,5 | +0,866 | 310,70 |
| 3 | -1 | 0 | 674,98 |
| 4 | -0,5 | -0,866 | 317,14 |
| 5 | 0,5 | -0,866 | 244,78 |
| 6 | -0,5 | 0,866 | 469,46 |
| 7 | 0 | 0 | 525,44 |
| 8 | 0 | 0 | 565,30 |
| 9 | 0 | 0 | 555,17 |

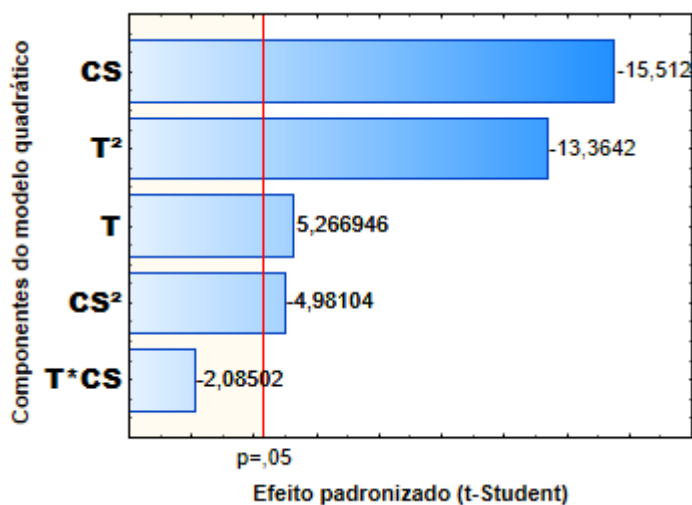


Figura 4.3 - Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura (T) e carga de substrato (CS) no modelo ajustado para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 (T*CS: interação entre os termos lineares T e CS).

A partir do gráfico de Pareto (Figura 4.3), o qual indica a significância dos efeitos padronizados dos termos de regressão, pôde-se observar que todos os termos lineares e quadráticos do modelo foram significativos a um nível de 95% de confiança. O efeito significativo de todos os termos lineares (T e CS) sugeriu que as duas variáveis investigadas foram críticas para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. O maior comprimento da barra que representa o efeito padronizado do termo linear CS indica que a carga de substrato foi a variável que exerceu maior influência sobre o processo de sacarificação. A significância dos termos quadráticos (T² e CS²) implicou que o rendimento de sacarificação foi marcadamente afetado pelas variáveis em estudo e que pequenas mudanças em seus respectivos valores afetariam o processo significativamente. O efeito do termo de interação entre as variáveis (T*CS) não foi significativo. Portanto, o coeficiente de regressão deste termo foi removido e um novo modelo reduzido foi construído por análise de regressão e submetido à ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 4.3). O modelo reduzido construído apresentou alta significância estatística, o que ficou evidente a partir do teste de Fisher para a regressão, sendo obtido um valor de F correspondente a 19,28 ($p < 0,01$).

Tabela 4.3 - ANOVA para o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos com o planejamento Doehlert.

| | SQ | GL | QM | F | P |
|-----------------|-------------|----|-----------|--------|-------|
| Regressão | 194240,8705 | 4 | 48560,218 | 19,283 | 0,007 |
| Resíduo | 10073,2879 | 4 | 2518,322 | | |
| Total | 204314,1584 | 8 | | | |
| Falta de ajuste | 858,4578 | 2 | 429,229 | 10,734 | 0,085 |
| Erro puro | 9214,8301 | 2 | 4607,415 | | |

$R^2 = 0,9507$; $R^2\text{-adj} = 0,9014$; GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; P, probabilidade.

O alto valor de R^2 (0,9507) indicou boa correlação entre os resultados experimentais e os valores previstos, sendo que 95,07% da variabilidade das respostas (açúcares redutores formados) pôde ser explicada e apenas 4,93% do total da variação não pode ser explicadas pelo modelo. Foi obtido um valor de $R^2\text{-adj}$ (0,9014) muito próximo ao valor de R^2 , o que ressaltou a significância dos termos considerados no modelo. O valor de falta de ajuste foi insignificante ($p = 0,085$). Esta afirmação pôde ser confirmada a partir dos gráficos de valores reais e previstos e o gráfico de resíduos representado na Figura 4.4, os quais evidenciaram que o modelo reduzido apresentou os valores das respostas previstas muito próximos aos valores das respostas experimentais. Além disso, os resíduos foram relativamente baixos e distribuídos de forma aleatória, tornando o modelo válido para construção da superfície de resposta e previsão das regiões desejadas.

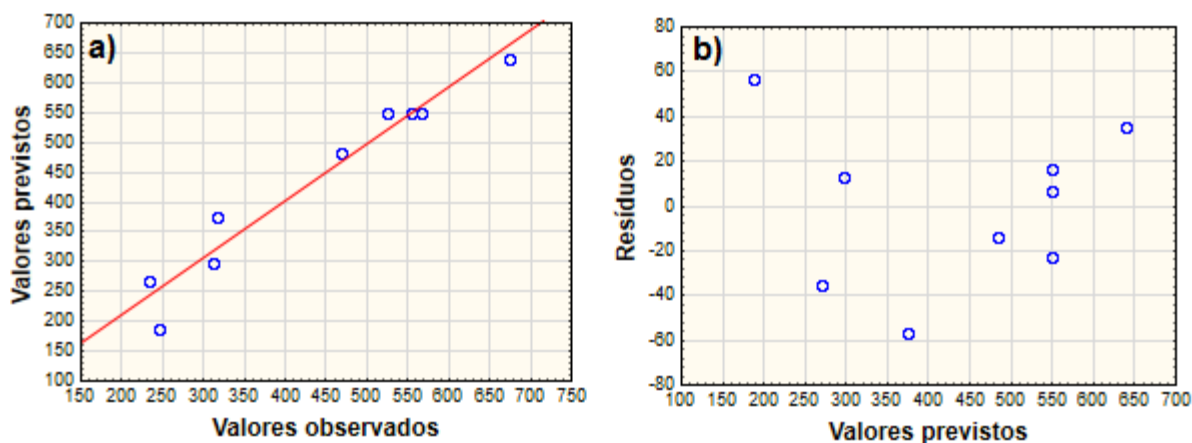


Figura 4.4 - Gráfico de valores reais x previstos (a) e gráfico de distribuição de resíduos (b) para o modelo reduzido ajustado para explicar a variabilidade dos resultados da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar utilizando xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110.

A equação 4.2 representa o modelo reduzido ajustado a partir dos resultados experimentais obtidos para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Y representa a quantidade de açúcares redutores liberados (resposta) ao passo que T e CS representam as variáveis independentes temperatura e carga de substrato em valores codificados.

$$Y = 548,64 - 185,55 CS - 94,20 CS^2 + 63,00 T - 252,77 T^2 \quad (4.2)$$

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figura 4.5), construídos a partir da equação 4.2, ilustram o efeito das variáveis e suas interações. A partir destes gráficos, ficou evidente que, dentro da região experimental estudada, a variável carga de substrato (CS) exerceu maior influência sobre o processo de sacarificação. A medida que a carga de substrato foi diminuída observou-se um aumento na produção de açúcares redutores. Greeg e Sanddler (1996) sugeriram que o menor rendimento de hidrólise resultante do aumento da concentração de substrato pode estar associado à inibição enzimática e consequente diminuição na reatividade do substrato. O processo de sacarificação também foi melhorado ao manter a temperatura na faixa de 60-65°C (Figura 4.5). Este resultado indica que a xilanase bruta utilizada no processo de hidrólise apresenta estabilidade e alta atividade nesta faixa de temperatura. A forma das curvas (pouco elíptica) demonstrou claramente que a interação entre as variáveis estudadas foi insignificante.

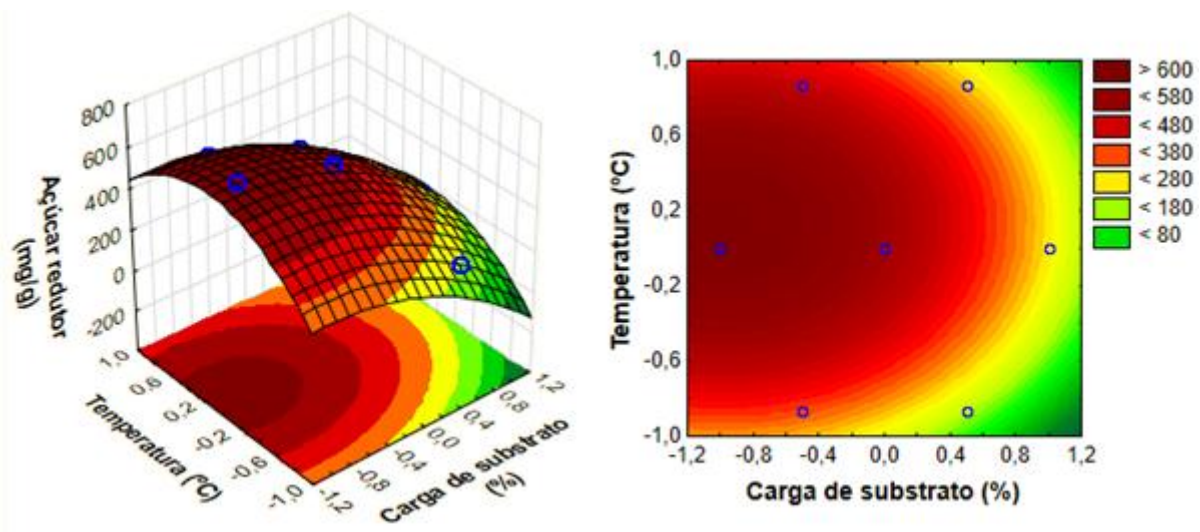


Figura 4.5 - Gráficos de superfície de resposta e de contorno construídos com base no modelo Y representando as interações entre as variáveis temperatura e carga de substrato, tendo-se como resposta a quantidade de açúcares redutores formados.

As condições de temperatura e carga de substrato para alcançar a máxima produção de açúcares redutores foram estimadas aplicando-se o critério de Lagrange juntamente com o determinante de Hessian à equação 4.2 (Ferreira et al., 2004). Os determinantes encontrados foram: $\Delta_1 = - 505,54$ e $\Delta_2 = 95243,74$, indicando um ponto de máximo para o modelo analisado, o que corroborou com a superfície de resposta ilustrada na Figura 4.5. A partir desses resultados foi possível prever um valor máximo de produção de açúcares redutores equivalente a 643,93 mg/g sob as condições de temperatura de 62,40°C e carga de substrato de 0,22%. Nestas condições, foi encontrado um valor médio real de 662,34 mg/g (triplicata), que foi bastante próximo ao valor previsto.

Bagaço de cana-de-açúcar tem sido apontado como matéria-prima para conversão em açúcares por hidrólise enzimática utilizando xilanase bruta ou purificada. Heck et al. (2006) alcançou uma produção de açúcares equivalente a 4,8 mg/g utilizando xilanase purificada produzida por *Bacillus circulans* BL53. Murthy e Naidu (2012) descreveram uma produção de açúcares equivalente a 10,62 mg/mL (106,2 mg/g) utilizando xilanase bruta produzida por *Penicillium* sp. CFR 303. O alto conteúdo de celulose (50%), hemicelulose (25%) e sua disponibilidade são os principais atrativos para a sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, o alto conteúdo de lignina (25%) (Pandey et al., 2000) torna este material recalcitrante à hidrólise por enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Garai e Kumar (2013), por exemplo, relataram a sacarificação (299,88 mg/g) de bagaço de cana-de-açúcar após um pré-tratamento com solução de amônia a 121°C utilizando xilanase bruta de *Aspergillus candidus*. Damaso et al. (2004) descreveram uma produção de xilose equivalente a 25,2 mg/g utilizando xilanase bruta produzida por *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 e etapas de pré-tratamento térmico e alcalino. Apesar de serem apontadas como promissoras, etapas de pré-tratamento podem encarecer o processo de sacarificação. A sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar por xilanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110 foi realizada sem a utilização de etapas de pré-tratamento (exceto a secagem e trituração do resíduo) e, ainda assim, apresentou resultados superiores aos relatados pelos trabalhos aqui citados.

4.4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o potencial de utilização do preparo de xilanase bruta obtida de *P. roqueforti* ATCC 10110 para sacarificação de resíduos lignocelulósicos sem a necessidade de pré-tratamento destes materiais (exceto a secagem e trituração dos resíduos). Dentre os resíduos analisados quanto a produção de açúcares, a maior produção alcançada foi frente ao bagaço de cana-de-açúcar como substrato. A adição de Mn^{2+} potencializou o processo de sacarificação deste resíduo e o estudo dos parâmetros de sacarificação como temperatura e carga de substrato permitiu maximizar o rendimento de açúcares. Os resultados alcançados neste trabalho sugerem a utilização de xilanase bruta suplementada de Mn^{2+} um processo alternativo e economicamente promissor quando comparado aos processos que utilizam enzimas puras e/ou necessitam de etapas de pré-tratamento para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar.

4.5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, e a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo.

4.6 REFERÊNCIAS

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51-57, 2016.

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

AVCI, A.; SAHA, B. C.; DIEN, B. S.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 603-612, 2013.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; DATTA, M.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012.

DAMASO, M. C. T.; DE CASTRO, A. M.; CASTRO, R. M.; ANDRADE, C. M. M. C.; PEREIRA JR, N. Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1003-1012, 2004.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

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

GARAI, D.; KUMAR, V. A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 352-363, 2013.

GHOSE, T; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 591, p. 739-52, 1987.

GHOSHAL, G.; BANERJEE, U. C.; SHIVHARE, U. S. Utilization of agrowaste and xylanase production in solid state fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 1013-1024, 2015.

GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 375-383, 1996.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 3, p. 179-184, 2006.

HONGDAN, Z.; SHAOHUA, X.; SHUBIN, W. Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 391-396, 2013.

KO, J. K.; XIMENES, E.; KIM, Y.; LADISCH, M. R. Adsorption of Enzyme Onto Lignins of Liquid Hot Water Pretreated Hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 447-456, 2015.

KOCABAS, D. S.; GÜDERB, S.; ÖZBENC, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 170-177, 2012.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; OLIVEIRA, M. B.; NAGEM, R. A. P.; VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. Characterization and biotechnological application of recombinant xylanases from *Aspergillus nidulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 60-67, 2016.

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

MOHANA, S.; SHAH, A.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7553–7564, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; CAMPOS, M. C.; SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A.; QUEIROZ, R. M. L.; FERREIRA FILHO, E. X. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46–52, 2013.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 657-664, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PENSUPA, N.; JIN, M.; KOKOLSKI, M.; ARCHER, D. B.; DU, C. A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 261-267, 2013.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014.

VASCONCELLOS, V. M.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Addition of metal ions to a (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **New Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 331-337, 2016.

VICUNA, R.; OYARZUN, E.; OSSES, M. Assessment of various commercial enzymes in the bleaching of radiata pine Kraft pulps. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 63-168, 1995.