



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE- FURG  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Produção de celulasas a partir de resíduo da indústria arroeira empregando  
*Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei***

**Larine Kupski**  
Engenheira de Alimentos

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana Badiale-Furlong – Orientadora  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Jaqueline Garda-Bufferon – Co-orientadora

RIO GRANDE, RS  
2012

Larine Kupski

**Produção de celulases a partir de resíduo da indústria arrozeira empregando  
*Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Rio Grande, RS

2012

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Ronaldo e Cristina, por todo amor e educação que sempre me disponibilizaram, por serem meu porto seguro em todos os momentos difíceis. Sem vocês não seria a pessoa que sou hoje e não teria chegado até aqui, por isso MUITO OBRIGADA. Aos meus irmãos Lucas e Larisse por aturarem meu comportamento difícil, principalmente nesses dois anos! A minha Vó, Loercira, que sempre foi e sempre será minha 2ª mãe. Obrigada pelos momentos de carinho que sempre me ofertasse, tu és uma pessoa muito especial para mim.

Ao João Felipe, meu amigo, namorado, companheiro de todas as h. Essa conquista também é tua... Obrigada pelo apoio incondicional dado durante todos esses anos, por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava, pelas idas aos finais de semana na FURG, por respeitar minha ausência em certos momentos!

Ao Leon e Gabriele, meus amigos, irmãos, companheiros de acampamento e que junto com o João Felipe completam o nosso quarteto fantástico. "Amigo é aquela pessoa que o tempo não apaga, que a distancia não esquece, que fica para sempre." Obrigada por todo apoio que vocês sempre me deram durante esses anos e pelos vários momentos de descontração!!

À minha orientadora Eliana, pessoa muito especial para mim! Com certeza o exemplo de profissional que eu quero seguir!! Uma pessoa dedicada, apaixonada pelo seu trabalho e que sempre tenta ver o lado bom das pessoas!! Obrigada pela confiança que sempre tiveste em mim, por me receber em seu laboratório, por acreditar que eu seria capaz de concluir mais essa etapa, por me apoiar nas minhas decisões. Sempre ficará guardado na minha lembrança nossas conversas, nossas voltas a pé para casa e acima de tudo nossa amizade. Com certeza, sou essa pessoa hoje graças a teu incentivo! Muito obrigada por tudo mesmo!!!

À minha co-orientadora Jaqueline, que desde a iniciação científica teve a paciência de me ensinar. És uma pessoa sensacional!!! Podes ter certeza que se estou aqui hoje devo muito a ti. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelo apoio na realização deste trabalho e principalmente pela amizade de todos esses anos!

À Fernanda, minha amiga girafona, co-co orientadora, companheira de academia! Não teria conseguido sem a tua ajuda! Obrigada pelas palavras de incentivo, amizade, pelas broncas necessárias, por escutar meus ataques (que não foram poucos), por me acalmar durante esses anos, pelas vindas na FURG fora de horário, por me ajudar no trabalho, por nossas jantadas animadíssimas....Enfim, obrigada pela nossa amizade...és uma pessoa muito importante para mim...e puedes ter certeza que minha vida não seria mais fácil na tua ausência (talvez a tua seria, hehe)!!!!

À Thaisa e a Eliane, amigas de longa data, que sempre confiaram no meu potencial e sempre conseguiram aturar meu jeito difícil durante toda a faculdade!!! Aprendi muito com vocês nesses anos!! Muito obrigada pela paciência, carinho, apoio, por me

auxiliarem nos momentos difíceis e por comemorarem comigo nos momentos de felicidade!!! Com certeza vocês são pessoas que vou levar para vida toda! Não importa a distância, sempre manteremos nossa amizade....afinal somos o TRIO MARAVILHA!

À Jesus, não só técnica do laboratório, mas também uma amiga, que me acolheu de braços abertos desde que entrei no laboratório!!!

Ao meu grupo de trabalho, Guta, Milena, Tiago e Gregory (no primeiro ano). Com certeza vocês foram e sempre serão mais que meus ajudantes, serão meus amigos... Obrigada por todo trabalho realizado, pela disposição apresentada nesses dois anos. Esse trabalho é de vocês também!!!

À todos componentes do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos amigos que eu ganhei durante todos esses anos de FURG: Cristiana, Anelise, Ana, Gabriela, Fran, Taiana, Priscila, Júlio, Vitor, Ana Cláudia, Franciela, Vivian, Melissa, Gini, Rosana, Letícia, Náthali Sílvia, Tânia, Michele, Luciana, Cristiano, Denise, Ricardo, Lisiane cada um com seu jeito de ser, mas todos muito especiais para mim. Muito obrigada pelas conversas diárias, por todas as risadas e principalmente pela paciência que vocês tiveram comigo!

À Capes pelo apoio financeiro.

**“Escolhe um trabalho de que gostes,  
e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”**

**Confúcio**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Biotecnologia e os Processos Fermentativos.....	4
3.2 Fermentação em estado sólido.....	5
3.2.1 Fatores que influenciam a FES .....	6
3.2.2 Aplicações da FES .....	9
3.3 Arroz.....	11
3.4 Micro-organismo .....	12
3.4.1 Gênero <i>Rhizopus</i> .....	14
3.4.2 Gênero <i>Trichoderma</i> .....	14
3.5 Enzimas.....	15
3.6 Produção de enzimas microbianas .....	16
3.7 Celulase.....	18
3.8 Amilases .....	21
3.9 Pectinases .....	22
3.10 Fatores que interferem na atividade enzimática.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1 Material.....	26
4.1.1 Substrato.....	26
4.1.2 Micro-organismos.....	26

4.2 Métodos.....	26
4.2.1 Caracterização físico-química do substrato .....	26
4.2.2 Padronização método de extração enzimática .....	27
4.2.3 Determinação de atividade enzimática de carboidrolases .....	27
4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de casca de arroz na atividade de carboidrolases.....	29
4.2.5 Estimativa do crescimento microbiano e teor de açúcares redutores no meio .....	29
4.2.6 Otimização da produção de enzimas celulolíticas empregando casca de arroz como substrato.....	30
4.2.7 Cinética de produção enzimática.....	31
4.2.8 Caracterização bioquímica das atividades celulolíticas .....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Caracterização físico-química dos substratos.....	35
5.2 Padronização do método de extração do complexo celulolítico .....	36
5.3 Efeito de diferentes concentrações de casca de arroz na atividade celulolítica..	38
5.4 Otimização da produção das enzimas: endoglicanase e celulase total .....	45
5.4.1 Avaliação da influência de solução nutriente e tipo de biorreator .....	68
5.5 Cinética de produção enzimática .....	70
5.6 Caracterização bioquímica das atividades celulolíticas.....	77
5.6.1 Determinação da temperatura ótima .....	77
5.6.2 Determinação do pH ótimo.....	78
5.6.3 Estabilidade térmica .....	80
5.6.4 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	87
6 CONCLUSÃO .....	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aplicações da FES em diferentes setores .....	10
Tabela 2- Aplicações recentes em FES.....	11
Tabela 3- Enzimas permitidas para uso em alimentos conforme a Resolução RDC nº 205 da ANVISA .....	18
Tabela 4- Condições estudadas para estabelecimento da extração de celulases da biomassa.....	27
Tabela 5- Composição proximal dos substratos (casca e farelo de arroz).....	35
Tabela 6- Solvente extrator e a atividade de celulase total e endoglicanase da biomassa.....	37
Tabela 7 – Efeito da velocidade e tempo de agitação na extração das celulases da biomassa.....	38
Tabela 8- Produtividade de endoglucanase e celulase total durante fermentação com <i>Rhizopus oryzae</i> .....	39
Tabela 9- Produtividade de endoglucanase e celulase total durante fermentação com <i>Trichoderma reesei</i> .....	39
Tabela 10- Produtividade de amilase e pectinase durante fermentação com <i>Rhizopus oryzae</i> .....	41
Tabela 11- Produtividade de amilase e pectinase durante fermentação com <i>Trichoderma reesei</i> .....	41
Tabela 12 – Produção de açúcares redutores no meio fermentativo .....	42
Tabela 13- Matriz do primeiro DCC 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>R. oryzae</i> .....	46
Tabela 14- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o primeiro DCC 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	46
Tabela 15 - ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o primeiro DCC 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	47
Tabela 16- Matriz do segundo DCC 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>R. oryzae</i> .....	48
Tabela 17- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o segundo DCC 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	49
Tabela 18- ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o segundo DCC 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	50
Tabela 19- Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>R. oryzae</i> .....	51
Tabela 20- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o DCCR 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	52

Tabela 21- ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o DCCR 2 <sup>2</sup> de <i>R. oryzae</i> .....	53
Tabela 22- Matriz do primeiro DCC 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>T. reesei</i> .....	55
Tabela 23- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o primeiro DCC 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	56
Tabela 24- ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o primeiro DCC 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	57
Tabela 25- Matriz do segundo DCC 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>T. reesei</i> .....	59
Tabela 26- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o primeiro DCC 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	60
Tabela 27- ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o segundo DCC 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	61
Tabela 28- Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> para processo fermentativo com <i>T. reesei</i> .....	63
Tabela 29- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o DCCR 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	64
Tabela 30- ANOVA para a resposta atividade específica (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> ) para o DCCR 2 <sup>2</sup> de <i>T. reesei</i> .....	65
Tabela 31- Produtividade e produtividade específica das enzimas celulolítica produzidas durante fermentação.....	72
Tabela 32- Influência da temperatura na atividade de endoglicanase e celulase total.....	77
Tabela 33- Influência do pH na atividade de endoglicanase e celulase total.....	79
Tabela 34- Resultados de Kd e t <sub>1/2</sub> para as enzimas produzidas por <i>R. oryzae</i> .....	84
Tabela 35- Resultados de Kd e t <sub>1/2</sub> para as enzimas produzidas por <i>T. reesei</i> .....	85
Tabela 36- Parâmetros cinéticos da endoglicanase obtida por <i>R. oryzae</i> e <i>T. reesei</i> .....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.....	19
Figura 2- Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexado (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e as não redutoras estão representadas em branco (adaptado de LYND et al., 2002).....	20
Figura 3- Produção de glicosamina durante fermentação de <i>R. oryzae</i> em meio contendo 1% (◇), 3% casca (■) e 5% (▲) de casca.....	43
Figura 4- Produção de glicosamina durante fermentação de <i>T. reesei</i> em meio contendo 1% (◇), 3% casca (■) e 5% (▲) de casca.....	44
Figura 5- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de endoglicanase por <i>R. oryzae</i> em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%). .....	54
Figura 6- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade específica de endoglicanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no primeiro DCC de <i>T. reesei</i> . .....	58
Figura 7- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no primeiro DCC de <i>T. reesei</i> . .....	58
Figura 8- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de endoglicanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no segundo DCC de <i>T. reesei</i> . .....	62
Figura 9- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no segundo DCC de <i>T. reesei</i> . .....	62
Figura 10- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de endoglicanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) do DCCR de <i>T. reesei</i> . .....	66
Figura 11- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) do DCCR de <i>T. reesei</i> . .....	66
Figura 12- Influência de biorreatores e solução nutriente nas atividades específicas para <i>R. oryzae</i> (a) e <i>T. reesei</i> (b). B- biorreator de bandeja; E-erlenmeyer; 1-ausência, 2- solução A, 3-solução B.....	69
Figura 13- Cinética de produção das enzimas endoglicanase (a) e celulase total (b) na condição otimizada de fermentação com <i>R. oryzae</i> .....	71
Figura 14- Cinética de produção das enzimas endoglicanase (a) e celulase total (b) na condição otimizada de fermentação com <i>T. reesei</i> .....	71

Figura 15- Cinética de produção das enzimas pectinase (a) e amilase (b) na condição otimizada de fermentação com <i>R. oryzae</i> .	74
Figura 16- Cinética de produção das enzimas pectinase (a) e amilase (b) na condição otimizada de fermentação com <i>T. reesei</i> .	74
Figura 17- Acompanhamento da produção de açúcares redutores durante fermentação com <i>R. oryzae</i> (a) e <i>T. reesei</i> (b).	75
Figura 18- Acompanhamento do crescimento fúngico durante fermentação com <i>R. oryzae</i> (a) e <i>T. reesei</i> (b).	76
Figura 19- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 25°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>R. oryzae</i> .	80
Figura 20- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 60°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>R. oryzae</i> .	81
Figura 21- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 80°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>R. oryzae</i> .	81
Figura 22- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 100°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>R. oryzae</i> .	82
Figura 23- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 25°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>T. reesei</i> .	82
Figura 24- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 60°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>T. reesei</i> .	83
Figura 25- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 80°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>T. reesei</i> .	83
Figura 26- Dados de $\ln(V/V_0)$ em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 100°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por <i>T. reesei</i> .	84
Figura 27- Constantes de desnaturação térmica $-\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) da endoglicanase e celulase total produzida por <i>R. oryzae</i> .	86
Figura 28- Constantes de desnaturação térmica $-\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) da endoglicanase e celulase total produzida por <i>T. reesei</i> .	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA- Análise de variância
- $a_w$ - Atividade de água
- CIG- Conselho Internacional de grãos
- DCC- Delineamento composto central
- DCCR- Delineamento composto central rotacional
- DNS- Dinitrossalicílico
- $E_a$ - Energia de ativação da reação enzimática
- $E_d$ - Energia de ativação da reação de desnaturação
- FAF- Farelo de arroz fermentado
- FAFD- Farelo de arroz fermentado desengordurado
- FAO- Food and Agriculture Organization
- F- Teste de Fisher
- FES- Fermentação em estado sólido
- GRAS- Generally Recognized as Safe
- $K_d$ - Constante da velocidade de desnaturação
- $K_M$ - Constante de Michaelis e Menten
- R- Constante universal dos gases
- R.oryzae*- *Rhizopus oryzae*
- T.reesei*- *Trichoderma reesei*
- $t_{1/2}$ - Tempo de meia vida
- $V_{m\acute{a}x}$ - Velocidade máxima
- $\mu$ - Velocidade de crescimento

## RESUMO

A produção de enzimas é um campo consolidado da biotecnologia, onde são utilizados processos de fermentação submersa, porém nas últimas décadas vem sendo observada a tendência de utilizar a fermentação em estado sólido para produção de diversas enzimas. As vantagens deste processo são simplicidade de meio de cultura, baixa demanda de energia, diminuindo o custo de produção. Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, as celulasas tem seu emprego destacado principalmente no Brasil pela aplicação na produção de biocombustíveis. O objetivo do trabalho foi produzir celulase através de fermentação em estado sólido com os micro-organismos GRAS *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, tendo casca e farelo de arroz como substrato. A caracterização físico-química dos substratos foi realizada. As condições de extração enzimática foram estudadas, variando-se o solvente extrator, o tempo e a velocidade de agitação. Para estabelecer condições ótimas de produção enzimática foi estudada a influência do teor de casca no meio e a umidade inicial no processo fermentativo através de planejamento experimental; o tempo de fermentação, tipo de biorreator e solução nutriente utilizados. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade a temperatura; os parâmetros  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  também foram avaliados. Além da produção celulolítica foi avaliada a produção de enzimas amilolíticas e pectinolíticas. A caracterização físico-química dos substratos indicou que a casca de arroz seria um bom indutor da atividade celulolítica, devido ao seu teor de fibras (43,6%). O melhor solvente para extrair o complexo enzimático foi NaCl 0,5% durante 30 min a 25°C sem agitação. Para *Rhizopus oryzae* as condições ideais para produção celulolítica foram obtidas com 15 h de fermentação em biorreatores de bandeja contendo como substrato 82,5% de casca e 17,5% de farelo de arroz e teor inicial de umidade de 30%, obtendo-se 0,094 e 0,206 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, para celulase total e endoglicanase, respectivamente. Para *Trichoderma reesei* a condição ideal consistia em fermentar em erlenmeyers, contendo somente casca de arroz com umidade inicial de 50%, durante 55 h, obtendo-se 0,110 e 0,605 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, para celulase total e endoglicanase, respectivamente. Para ambos os micro-organismos foi utilizada a solução nutriente contendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. O pH ótimo para atuação da endoglicanase foi de 5,0 e 6,0 e da celulase total 6,0 e 5,0 para *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, respectivamente. A temperatura ótima das enzimas celulolíticas foi 60 °C sendo as produzidas por *Rhizopus oryzae* mais estáveis termicamente que as de *Trichoderma reesei*. As endoglicanase produzidas por *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* apresentaram valores de  $K_M$  de 0,01 e 0,20 mg/mL, respectivamente.

Palavras chave: celulase, casca de arroz, fermentação em estado sólido

## ABSTRACT

### Cellulase production from rice industry waste using *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*

Enzymes production is a consolidated field within biotechnology, where submerged fermentation process are utilized to this purpose. However, in the last decades, a trend of applying solid state fermentation in order to produce several enzymes has begun. Such procedure advantages are its culture media simplicity and low energy needs, decreasing production costs. Among enzymes used in industrial facilities, cellulases have its applications highlighted, especially in Brazil, due to biofuels production. This work objective was producing cellulase through solid state fermentation with the GRAS microorganisms *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*, with rice hull and bran as substrate. Physico-chemical characterization was realized. Enzyme extraction conditions were studied by varying the extraction solvent, time and agitation. To establish optimum enzyme production conditions hull percentage in media and initial humidity influences were studied through experimental design. After the optimization, fermentation time, bioreactor type and nutrient solution effects were evaluated. Enzymes were characterized regarding optimum pH and temperature, thermal stability as well by its  $K_m$  and  $V_{max}$  parameters. The amylolytic and pectinolytic enzymes productions were also evaluated. Substrates physico-chemical characterization demonstrated that rice hull would induce well cellulolytic activity due to its high fiber content (43,6%). The solvent that extracted best the enzymatic complex was NaCl 0,5% when applied for 30 minutes at 25°C without agitation. For *Rhizopus oryzae* the ideal conditions for cellulolytic production were obtained with 15 h fermentation time in tray bioreactors containing 82,5% of rice hull, 17,5% bran and 30% initial humidity, obtaining 0,094 and 0,206 U.mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup> for total cellulase and endoglucanase, respectively. For *Trichoderma reesei* the best condition consist in fermenting with erlenmeyers containing only rice hull with 50% initial humidity for 55 h, obtaining 0,110 and 0,605 U.mg<sub>protein</sub><sup>-1</sup> for total cellulase and endoglucanase, respectively. Both microorganisms utilized nutrients solution containing KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Besides cellulolytic activity, amylolytic and pectinolytic production were also evaluated. Optimum pH for endoglucanase activity regarding *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei* were, respectively, 5,0 and 6,0 and total cellulolytic enzymes were 6,0 and 5,0. Cellulolytic enzymes optimum temperature was 60°C. The enzymes produced by *Rhizopus oryzae* were more thermostable than the ones synthesized by *Trichoderma reesei*. *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei* endoglucanases presented  $K_m$  of 0,01 and 0,02 mg.ml<sup>-1</sup>, respectively.

Keywords: cellulase, rice hull, solid state fermentation.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado industrial de enzimas continua crescendo devido a novas tecnologias de produção, ao uso da engenharia genética na produção e ao surgimento de novos campos de aplicação. Em 2004, houve uma demanda industrial de enzimas de 2,5 bilhões de dólares, com um crescimento anual de 5 a 10%. Mais de 90% do mercado de vendas encontra-se nos Estados Unidos, Europa e Japão. É esperado que o mercado global de enzimas em 2012 seja de 2,7 bilhões de dólares (IYER e ANANTHARAYAN, 2008). As enzimas podem ser obtidas a partir de fermentações microbianas, suplementando as de origem vegetal, devido a utilização de substratos com baixo valor de mercado e curto tempo de produção.

Aspectos estes que propiciam a utilização de subprodutos da indústria arrozeira que se destaca no Rio Grande do Sul pela produção de 9,5 milhões de toneladas de grãos no ano de 2011/2012 (CONAB, 2012). A casca e o farelo de arroz representam 30% da matéria prima processada e nesse sentido, a fermentação em estado sólido (FES) é um caminho alternativo para agregar valor a este material e diminuir possíveis problemas ambientais, produzindo substâncias de interesse para diferentes setores, como enzimas, hormônios, pigmentos, entre outros, contribuindo para uma maior diversificação do agro-negócio nacional (BHAT, 2000).

Entre as enzimas produzidas por FES, encontram-se as carboidrolases, que podem ser aplicadas em diferentes setores industriais, tais como indústrias alimentícias, de ração animal, têxtil, detergente, cervejarias (SINGANHIA et al., 2010). As celulasas, enzimas de grande importância econômica principalmente na obtenção de bioetanol, constituem um complexo enzimático formado por exo- $\beta$ -1,4-glicanases (EC 3.2.1.91), endo- $\beta$ -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4) e  $\beta$ -1,4-glicanases (EC 3.2.1.21) que atuam sinergicamente na conversão da celulose cristalina a glicose (DILLON et al., 2008).

Diversos micro-organismos podem ser utilizados para produção de enzimas, porém a seleção destes dependerá de suas características fisiológicas. Além disso, para o uso de algum micro-organismo deve-se considerar o fato desses pertencerem ao grupo GRAS ("Generally Recognized as Safe") e serem aceitos pelo FDA ("Food and Drug Administration") (FURLAN et al., 2000).

Os fungos filamentosos estão entre os micro-organismos mais adaptáveis a FES, devido a sua capacidade de crescimento na forma de hifas que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (GRAMINHA et al., 2008). Entre os fungos,

*Trichoderma reesei* tem sido amplamente pesquisado pela sua capacidade de produção de enzimas do complexo celulolítico (WEBER e AGBLEVOR, 2005; MARTINS et al., 2008; LEVER, HO e CORD-RUWISCH, 2010).

O *Rhizopus oryzae* é um fungo conhecido pela capacidade de produzir proteases (KUMAR et al.,2005), lipases (HIOL et al., 2000; KHARRAT et al., 2011) fumarases (SONG et al.,2011) e xilanases (BAKIR et al.,2001). No entanto, relatos sobre a produção de enzimas do complexo celulolítico são escassos para esta espécie (MURASHIMA et al., 2002). Oliveira et al. (2010) verificaram que a fermentação de farelo de arroz com *Rhizopus oryzae* CCT 7560 propiciava aumento no teor de açúcares redutores no meio, não correlacionado com a baixa atividade amilolítica observada, indicando a produção de outro complexo enzimático responsável por este comportamento.

O fato de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 ser um micro-organismo GRAS e ter sido isolado do arroz com casca justificam a investigação do seu uso na produção de enzimas do complexo celulolítico mediante fermentação em estado sólido utilizando os co-produtos da indústria arroseira como substrato, corroborando na busca de novas fontes microbianas para produção enzimática e na diminuição dos custos de produção mediante o uso de substrato de baixo custo e amplamente utilizados. Outro fator que encarece o custo de produção é o processo de purificação, cujas etapas realizadas são proporcionais a finalidade do emprego da enzima, podendo ser utilizados o extrato enzimático bruto quando se pretende a utilização de um complexo enzimático para digerir matéria constituída por carboidrato complexo.

Norteadado pelo contexto atual de demandas e pelos fatos experimentais observados, a utilização de subprodutos, amplamente encontrados na Região Sul, como substrato para produção enzimática durante cultivo em estado sólido, torna-se interessante, do ponto de vista econômico e ambiental.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir celulases através de fermentação em estado sólido com os micro-organismos GRAS *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, tendo casca e farelo de arroz como substrato.

### 2.2 Objetivos específicos

Estabelecer condições ótimas para a produção de celulase total e endoglicanase para ambos os micro-organismos por fermentação em estado sólido.

Estudar a cinética de produção enzimática das enzimas celulolíticas e acompanhar a produção de outras carboidrolases.

Caracterizar as atividades das enzimas celulolíticas obtidas tendo a casca de arroz como principal fonte de carbono.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Biotecnologia e os Processos Fermentativos

Processos biológicos têm sido utilizados para obtenção de vários produtos, principalmente alimentos, muito antes do início da era cristã, confundindo-se com a própria história da humanidade. O preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais era prática comum na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), a produção de cerveja e pão utilizando fermentos já era realizada no Egito (4.000 anos a.C.) e a produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.). Outras aplicações são na produção de vinagre, iogurte e queijos, há muito tempo realizadas pelo ser humano (BORZANI et al., 2001). De alguma maneira, a Biotecnologia sempre esteve integrada à vida humana, porém, foi somente no final do século XIX que Louis Pasteur demonstrou o papel dos micro-organismos nos chamados processos fermentativos, derrubando a teoria de que a fermentação era puramente química. Pasteur também provou que cada tipo de fermentação era realizado por um micro-organismo específico e que este podia viver e se reproduzir na ausência de ar, porém, foi somente na década de 50 que o termo biotecnologia passou a ser difundido juntamente com o advento da Engenharia Genética (VILLEN, 2010).

A fermentação, do ponto de vista bioquímico, é um termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). É um processo comumente desenvolvido por micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) cujo desempenho depende muito da composição do meio de cultura onde são colocados (LIMA et al., 2001), pois cada ser vivo responde de maneira única ao ambiente, usando mecanismos físicos ou químicos para a formação do produto desejado.

Os meios de cultivo podem ser divididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos apresentam composição química bem conhecida, enquanto os naturais apresentam composição química complexa, geralmente desconhecida, sendo normalmente preferidos pelo menor custo (LIMA et al., 2001).

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto à condução do processo, quanto ao modo de cultivo, ou seja, processos em estado sólido ou submerso (REGULY, 2000).

### 3.2 Fermentação em estado sólido

O termo fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida, aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos com reduzida quantidade de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (ROCHA, 2010).

O material sólido, utilizado nesta fermentação, é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado. Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial, no entanto os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados, de 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SPIER, 2005).

Embora a produção de enzimas em escala industrial seja principalmente realizada por fermentação submersa, nas últimas décadas tem sido verificada uma tendência para produção de diversas enzimas pela FES (COUTO e SANROMÁN, 2005). O uso da FES ou da fermentação submersa deve ser estudado de acordo com o micro-organismo a ser utilizado e o produto que se deseja obter.

A fermentação no estado sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade de meio de cultura; redução dos efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações resultantes da baixa umidade do meio fermentativo; condições de cultura próximas ao dos meios naturais; fácil aeração devido à porosidade do material; utilização direta dos sólidos fermentados; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor do que o da cultura líquida; baixa demanda de energia (SINGHANIA et al., 2010).

Uma vantagem da FES, quando comparada à fermentação submersa, de acordo com Ramana, Karanth e Raghava Rao (1993), está na produção de enzimas fúngicas. Isto é observado em termos de produtividade enzimática e recuperação do produto.

Além das vantagens, a FES também apresenta algumas desvantagens como: risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas); difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade); pré-tratamento dos suportes

(umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático); alta taxa de inoculação, quando não se utiliza a microflora natural; estimativa precisa de biomassa; papel essencial da umidade e da atividade de água (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

### **3.2.1 Fatores que influenciam a FES**

#### **Atividade de água ( $a_w$ ) e umidade**

Na FES, a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da fase sólida, sendo que esta quantidade deve ser suficiente para o desenvolvimento dos micro-organismos sem destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato ou do suporte (GERVAIS e MOLIN, 2003).

Umidade elevada do substrato provoca diminuição da porosidade da matriz sólida, resultando em fraca difusão de oxigênio aumentando o risco de contaminações bacterianas. Por outro lado, uma baixa umidade leva a um crescimento limitado e diminui a acessibilidade do substrato. Durante a FES, ocorrem mudanças na atividade de água, devido à perda de umidade do meio com o calor e liberação de água do metabolismo microbiano (LONSANE et al., 1985).

A água desempenha um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença de água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

Geralmente, as bactérias se desenvolvem em atividades de água elevadas entre 0,85 e 0,99, as leveduras crescem melhor em 0,75 a 0,9 e os fungos entre 0,6 e 0,9. A umidade varia entre os micro-organismos empregados, produtos a serem produzidos e tipo de substrato utilizado. Portanto, em geral os tipos de micro-organismos que podem se desenvolver em sistemas de FES são determinados pelo fator atividade de água (RAIMBAULT, 1998).

Os fungos filamentosos podem se desenvolver em umidades muito baixas, da ordem de 12%, porém os níveis de umidade relativa variam entre 12 a aproximadamente 80%. A umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte (LONSANE et al., 1985)

tolerando também pressões osmóticas elevadas tais características não são encontradas nas leveduras e bactérias.

### **Temperatura**

Os processos fermentativos caracterizam-se por serem exotérmicos. Durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação de esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2003).

### **pH**

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido o controle e monitoramento deste parâmetro, durante a FES, não é fácil de ser realizado (PANDEY, 2003).

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa, preparada a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum. Entretanto, a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para medida do pH, tendo-se como determinação exata do mesmo, somente no início e no final do processo fermentativo (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000).

Para reduzir o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALDO, 2001).

### **Aeração**

O controle do ambiente gasoso na FES aeróbica é um fator importante para o desenvolvimento dos micro-organismos, que depende da velocidade do fluxo de oxigênio pelo substrato e da rapidez de consumo de  $O_2$  pelos micro-organismos. A aeração desempenha diferentes funções: provisão de  $O_2$  para o crescimento aeróbio e

metabolismo; regulação da umidade; regulação da temperatura; eliminação de vapor d'água, CO<sub>2</sub> e alguns metabólitos voláteis (MACIEL et al., 2009).

Existem diferentes maneiras para se obter uma movimentação do ar por entre o substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio, quer seja pela utilização do material poroso medianamente granulado ou fibroso, pelo uso de pequena espessura da camada de substrato, pela utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo de tela de arame, pela agitação do substrato ou ainda pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALDO, 2001).

### **Substratos**

A seleção do substrato adequado para FES depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso. A biomassa, na sua forma natural ou em resíduos da agricultura e resíduos florestais, é gerada em muitas toneladas anualmente, o que pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo na natureza (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000). Além disso, a falta de aplicação prática deixa de agregar valor a estes resíduos, que poderiam gerar lucros para os mais diversos setores (visto a possível utilização em FES).

Os coprodutos e resíduos agro-industriais são os substratos mais pesquisados. Em geral são baratos e abundantes. Além do mais, tem estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúvel em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. Os grupos de pesquisa existente aproveitam substratos naturalmente abundantes em sua região, tendo como exemplos, o bagaço de laranja e de cana, farelo de trigo e de arroz, polpa de maçã e café, farelo de soja, quirela de milho, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, etc. Normalmente são materiais particulados, e a água presente no meio encontra-se complexada na matriz sólida, a qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura micelial de fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Os materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. No entanto, alguns nutrientes importantes para o processo encontram-se em concentrações muito baixas, sendo necessária a suplementação do meio, outras vezes, os substratos, principalmente os de origem

lignocelulósica, podem ser submetidos a pré-tratamentos (químicos ou mecânicos) para serem mais facilmente aproveitados pelos micro-organismos (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

### **3.2.2 Aplicações da FES**

A utilização da FES não é recente. Desde o início da história o homem tem feito uso de micro-organismos para seu benefício, mesmo não compreendendo os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações. Dentro deste contexto, os processos de FES, representam um importante papel, pois se sabe que várias formas de alimentos, utilizando esse cultivo microbiano, fazem parte da dieta dos povos dos países Orientais, Asiáticos e Africanos há muitos séculos (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALDO, 2001; PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

Devido à grande utilização deste processo em diversos setores (Tabela 1), a necessidade de desenvolvimento de novos processos em FES e otimização dos processos existentes torna-se de interesse econômico, levando-se ainda em consideração as vantagens que este tipo de fermentação oferece em diversos segmentos (MACIEL et al., 2009).

Tabela 1- Aplicações da FES em diferentes setores

Setor	Aplicação	Exemplos
Indústria agro-alimentar	Fermentação de alimentos	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos fermentados
	Produção de cogumelos	<i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Shiitaki</i>
	Bioconversão de resíduos	Compostagem, detoxificação, ensilagem
	Aditivos alimentares	Aromas, gorduras essenciais, ácidos orgânicos
Agricultura	Biocontrole, bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarrhizium</i> , <i>Trichoderma</i>
	Crescimento de plantas	Giberilinas, <i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i>
	Micorrização	Inóculo de plantas
Fermentação industrial	Ácidos orgânicos	Ácido cítrico, fumárico, gálico, láctico
	Etanol	<i>Schwanniomyces</i> sp
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcalóides
	Enzimas	Amilases, celulasas, pectinases, proteases, xilanases
	Antibióticos	Penicilina, probióticos

Fonte: RAIMBAULT, 1998.

A Tabela 2 mostra alguns exemplos de aplicações recentes da FES, com os mais variados substratos e micro-organismos.

Tabela 2- Aplicações recentes em FES

Produto(s)	Substrato/Suporte	Micro-organismo(s)	Referência
Alfa-amilase, amiloglicosidase	Fécula de mandioca Bagaço de cana	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>delemar</i> , <i>formosa</i> , <i>arrhizus</i> , <i>circicans</i> , <i>oligosporos</i> <i>Aspergillus niger</i>	Spier, 2005
Xilanase	Bagaço de cana Farelo de soja	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	Maciel et al., 2009
Celulase	Resíduo de uva	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Dedavid et al., 2009
Celulase, xilanase	Palha de milho	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotou et al., 2003
Invertase, amilase, celulase, pectinase, protease	Casca e farelo de arroz (1:1) e casca de maracujá	<i>Aspergillus niger</i>	Rocha, 2010
Quitosana	Batata doce	<i>Gongronella butleri</i>	Nwe et al., 2002
Enriquecimento protéico	Farelo de arroz	<i>Rhizopus oryzae</i>	Oliveira et al., 2010

Observa-se que os resíduos lignocelulósicos vêm sendo amplamente estudados, destacando o farelo de arroz e o bagaço de cana, e entre os micro-organismos os mais utilizados pertencem ao gênero *Rhizopus* e *Aspergillus*.

### 3.3 Arroz

Segundo o relatório de outubro do Conselho Internacional de Grãos (CIG), a produção mundial de arroz deverá totalizar 459 milhões de toneladas (beneficiadas) em 2011/2012. Para 2012 a estimativa de produção nacional é de 12,71 milhões de toneladas (CONAB, 2012), sendo a Região Sul responsável por 74% da produção, destacando-se o Rio Grande do Sul com 65% da produção.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é dentre os cereais cultivados o que mais se destaca, por ser alimento básico na maioria da população. Segundo a FAO (2010) já foram identificadas 140.000 variedades de arroz, sendo que as principais diferenças observadas entre elas são: origem genética (japônica ou índica), dimensões (curto,

médio e longo) e composição do amido quanto ao teor de amilose (baixo, médio ou alto).

Apenas uma pequena quantidade de arroz é consumida como ingrediente em produtos processados, sendo seu maior consumo na forma de grão. O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. Nos países em desenvolvimento, onde o arroz é um dos principais alimentos da dieta, ele é responsável por fornecer, em média, 715 kcal per capita por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídios da alimentação. No Brasil, o consumo per capita é de 108 g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta. Estes dados demonstram a importância do arroz e de sua qualidade nutricional na saúde de grande parte da população mundial e nacional (WALTER, MARCHEZAN e AVILA, 2008).

No processo de beneficiamento do arroz, após a retirada da casca, são removidas as camadas mais externas do grão que compreendem pericarpo, tegumento, camada de aleurona e parte do endosperma, dando origem ao farelo. A natureza e composição do farelo de arroz dependem do sistema ou grau de polimento, contaminação com casca e a severidade da parboilização para arroz parboilizado (AMISSAH et al., 2003).

O farelo de arroz é um componente obtido quando removido do endosperma amiláceo no beneficiamento do grão. As diferentes etapas do beneficiamento do grão para comercialização podem resultar na seguinte distribuição média: casca 24%, farelo 8 a 10% e arroz polido 68%. Ao se observar a composição centesimal destas porções se verifica que o farelo possui os mais elevados teores de proteína (13 a 15%) em relação a 5 a 8% no arroz polido e 3 a 3,5% na casca. O mesmo se verifica com o conteúdo lipídico que perfaz no farelo 15 a 17% contra 0,3 a 0,6% no arroz polido e 0,8% na casca e seus maiores constituintes são os ácidos oléico e linoléico, e ésteres do ácido palmítico. O componente fibra também é abundante perfazendo 8,5 a 10% (AMATO, 2010).

### **3.4 Micro-organismo**

A seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES (PANDEY, 1992). Eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio.

Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto e apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico, ser patogênicos, exigir condições de processo muito complexas, exigir meios de cultura dispendiosos (LIMA et al., 2001).

Os micro-organismos utilizados na fermentação em estado sólido restringem-se àqueles capazes de crescer em baixas atividades de água, principalmente fungos e leveduras. Todavia, o uso de bactérias tem sido reportado em casos de compostagem, produção de inulinase a partir de *Staphylococcus sp* e ácido glutâmico a partir de *Brevibacterium sp*. As leveduras podem ser utilizadas para a produção de etanol, alimentos e ração animal (PANDEY, 2003; PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000; RAIMBAULT, 1998).

Os principais micro-organismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZKE e PUTZKE, 2004). A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em meios com teor de umidade da ordem de 15 % e com atividade de água ( $a_w$ ) de aproximadamente 0,7 (LONSANE et al., 1985).

Os fungos se reproduzem por meio de esporos, que em condições favoráveis, absorve água, aumenta de tamanho e germina emitindo um tubo germinal, que se alonga por crescimento da extremidade distal e se tornam filamentos longos que se ramificam. Cada filamento é chamado hifa, que com o crescimento pode ser dividida em uma cadeia de células pela formação de paredes transversais ou septos. Esses septos dividem as hifas em células uninucleadas e multinucleadas. As hifas que são divididas por septo são chamadas hifas septadas. Alguns fungos, entretanto, apresentam hifas não-septadas, como por exemplo, os do gênero *Rhizopus* (NEDER, 1992).

Continuando o crescimento, as hifas podem se ramificar diversas vezes e se entrelaçar, formando uma estrutura chamada micélio. A parte do micélio que penetra no substrato, digerindo-o e absorvendo-o, é conhecida como micélio vegetativo; a parte que é responsável pela produção de esporo e usualmente se estende para o ar é chamado micélio reprodutivo. O micélio reprodutivo e seus esporos variam grandemente nas diferentes espécies de fungos e servem para classificá-los e

identificá-los. Como resultado do crescimento, uma colônia filamentosa é formada. O tipo de micélio encontrado na colônia filamentosa é de grande importância para distinguir a classe de fungo (PELCZAR et al., 2010).

#### **3.4.1 Gênero *Rhizopus***

Os micro-organismos pertencentes a este gênero são classificados como zigomicetas, da ordem *Mucorales* sendo considerados dentro do reino os mais primitivos. São bolores que formam micélio cenocítico e apresentam rizóides para fixação ao substrato. Apresentam reprodução assexuada e sexuada. Na reprodução assexuada há formação de esporângios, estruturas constituintes dos esporos. Uma desintegração dos esporângios ocorre, quando os mesmos estão maduros, liberando os esporos que germinam e formam novas hifas. Na reprodução sexuada ocorre aproximação de duas hifas de indivíduos diferentes, as extremidades das mesmas se fundem originando um zigoto de parede espessa e resistente, denominado zigospóro. Este, passado o período de dormência, sofre meiose e germina originando um novo micélio (PITT e HOCKING, 1997).

O grande interesse nos fungos deste gênero decorre de que ele não possui espécies toxigênicas, fato que pode justificar a grande facilidade de contaminação de materiais onde eles se desenvolvem por outras espécies fúngicas (PITT e HOCKING, 1997).

Estudos demonstraram que o fungo do gênero *Rhizopus* é utilizado para a produção de enzimas como a amiloglicosidase (SOCCOL et al., 1994; WAINWRIGHT, 1995; COSTA, 1996; SPIER, 2005); proteases ácidas (FELLOWS, 1994); pectinases, lipases (WAINWRIGHT, 1995) e celulases (MURASHIMA et al., 2002; GOULART, CARMONA e MONTI, 2005).

#### **3.4.2 Gênero *Trichoderma***

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos, mesofílicos, que normalmente habitam o solo, faz parte da classe dos fungos deuteromicetos, pertencente à subclasse *Hifomicetos*, ordem *Moniliales*. Juntamente com *Neurospora*, *Penicillium* e *Aspergillus*, o gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico. Estes fungos se reproduzem

assexuadamente, através dos conidióforos, originados nas hifas, que produzem conídios. São mesófilos sensíveis a altas temperaturas e pH extremos, apesar de desenvolverem melhor em condições ácidas (MELO, 1996).

O gênero *Trichoderma* é caracteristicamente reconhecido pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (BÉGUIN, 1990). Em particular, *Trichoderma reesei* se destaca por sua grande capacidade de produzir e secretar um sistema multienzimático, induzível, de enzimas celulolíticas (ALCALDE, 2002; SEHNEM et al., 2006).

Espécies de *Trichoderma* são as fontes preferidas para obtenção de celulasas em função da sua capacidade de produção de proteínas extracelulares, em comparação com as bactérias celulolíticas. São produzidas basicamente endoglicanases e exoglicanases, ambas envolvidas na hidrólise da celulose, além disso, é incluída uma série de enzimas complementares, como  $\beta$ -glicosidase, hemicelulasas e pectinases (BERLIN et al., 2005).

### 3.5 Enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. As enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram muito a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, desde os mais simples, como formas unicelulares de vida, aos mais desenvolvidos (HARGER, SPRADA e HIRATSUKA, 1982).

Uma das características das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos são a especificidade e a promoção de somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas, resultando em menores problemas ambientais e toxicológicos. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que catalisam: oxiredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

De acordo com Harger, Sprada e Hiratsuka (1982), as enzimas podem ser obtidas de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi, ficina do figo); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase,

renina) e micro-organismos (como por exemplo, as amilases, proteases, pectinases, invertases, glicose-oxidases, celulasas, fitases, glicose-isomerases), de origem fúngica ou bacteriana. No entanto, atualmente, a produção por micro-organismos tem suplementado as de origem vegetal, devido a utilização de substratos de baixo custo e curto tempo produção.

A utilização de catalisadores enzimáticos nos mais diferentes ramos industriais tem sido uma tendência cada vez maior em todo o mundo. O mercado se encontra dividido em três segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas industriais de detergente, amido, têxtil, álcool, combustível, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002; MUSSATO, FERNANDES e MILAGRES, 2007)

Dentre as enzimas mais utilizadas estão às proteases, na indústria de detergentes, processamento de carne, leite e soja e tratamento do couro (CHERRY e FIDANTSEF, 2003). As amilases além de estarem presentes na formulação de detergentes enzimáticos, são importantes para conferir maior qualidade no processo de panificação e na fermentação da cerveja (MITIDIERI et al., 2006) e as celulasas que são produzidas por uma diversidade de micro-organismos em condições de anaerobiose e aerobiose e temperaturas, fundamentais para a obtenção de açúcares a partir da celulose como fonte de carbono e importantes para a reciclagem do elemento carbono na biosfera (DEDAVID et al., 2009; CAMASSOLA e DILLON, 2010).

### **3.6 Produção de enzimas microbianas**

As enzimas industriais são bons representantes de processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando em diversos produtos novos, no melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado (BCC, 2005). No entanto, o custo de uma enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo. Reduzir os custos de produção por otimizar o meio fermentativo e o processo é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (PARK et al., 2002).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto intervalo de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples e de baixo custo; e a preparação enzimática obtida

deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos micro-organismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (FELLOWS, 1994).

Reconhecidamente, as células microbianas são importantes produtoras de enzimas, oferecendo uma série de vantagens: a produção pode ser aumentada facilmente, apresenta natureza diversa permitindo a produção de várias enzimas, são relativamente fáceis de serem cultivadas em ambiente controlado e são altamente sensíveis a alterações genéticas, o que permite obtenção de linhagens melhoradas quanto à produção e qualidade da enzima. O processo fermentativo permite também a produção de enzimas com consistente produtividade e menor custo (NOSB, 1999).

As enzimas são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, ou pela combinação desses e de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular, que pode ser extraída por precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração (KILIKIAN e PESSOA JR., 2005).

As enzimas microbianas apresentam várias vantagens sobre as enzimas de origem animal ou de plantas, tais como custos de produção relativamente baixos, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, características físico-químicas diferentes, geralmente relacionadas ao hábitat e fisiologia do micro-organismo produtor, possibilidade de manipulação genética e representam recurso renovável. Enzimas com a mesma forma de atuação sob o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a seleção de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas (PASTORE, 2002).

As celulasas fúngicas têm sido estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (NG, 2004). Entre os produtores de celulasas estão os gêneros, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002).

O Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova a utilização de enzimas na indústria de alimentos, considerando que o uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado e que as

enzimas de origem microbiana devem ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a introdução de micro-organismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis. A Tabela 3 apresenta enzimas de origem microbiana permitidas para o uso em alimentos destinados ao consumo humano.

Tabela 3- Enzimas permitidas para uso em alimentos conforme a Resolução RDC nº 205 da ANVISA

ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA	
Nome da enzima ou complexo	Fonte(s)
Pectinase	<i>Aspergillus awamori</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Penicillium simplicissium</i>
	<i>Rhizopus oryzae</i>
Celulase	<i>Rhizopus oryzae</i>
	<i>Sporotrichum dimorphosporum</i>
	<i>Thielavia terrestris</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
α-amilase	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Rhizopus oryzae</i>
	<i>Rhizopus delemar</i>

### 3.7 Celulase

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante do globo terrestre e possui importância mundial como matéria-prima industrial e fonte de energia renovável (JOSHI e MANSFIELD, 2007).

A celulose constitui a parede celular dos vegetais, encontrada em toda planta na combinação com lignina e hemicelulose, é um homopolissacarídeo linear (parte amorfa e parte cristalino), constituído por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , duas unidades adjacentes formam a celobiose, que se

repete, apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (Figura 1) (GALDEANO, 2001; LIMA et al., 2001).

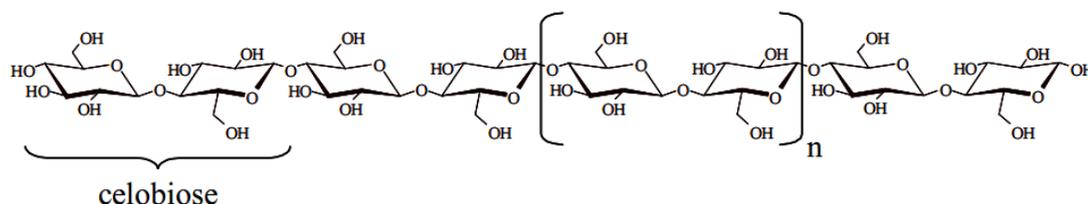


Figura 1- Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.

As cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias. Estas microfibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo, denominadas regiões cristalinas e as regiões com menor grau de ordenação são denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência à hidrólise ácida ou enzimática (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Diferentemente do amido, um polímero de reserva, a celulose possui papel estrutural, protegendo a célula vegetal contra a ação da pressão osmótica e estresses mecânicos. Nos ambientes naturais a celulose é digerida exclusivamente por microorganismos distribuídos entre o grupo das bactérias e dos fungos. A degradação microbiana da celulose é realizada pela atuação de um complexo enzimático, as celulases (HAICHAR et al., 2007). Estas são produzidas por um espectro de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulases em quantidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (BHAT e BHAT, 1997).

Essas enzimas fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações  $\beta$ -1,4, entre as moléculas de glicose (HAICHAR et al., 2007). O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglicanases (1,4- $\beta$ -D-glucanglucanohidrolase), exoglicanases (exo 1,4-  $\beta$ -D-glucan-celobiohidrolase) e  $\beta$ -Dglicosidasas ou celobiasas (JUHÁSZ et al., 2005).

O processo de clivagem das ligações  $\beta$ -1,4 da celulose é efetuado por enzimas celulásicas, atuando de modo complexo, denominado celulosomas, no caso de

bactérias anaeróbicas (DESVAUX, 2005) ou não complexada, no caso de fungos e também de bactérias aeróbicas (Figura 2) (LYND et al., 2002; BHAT e BHAT, 1997).

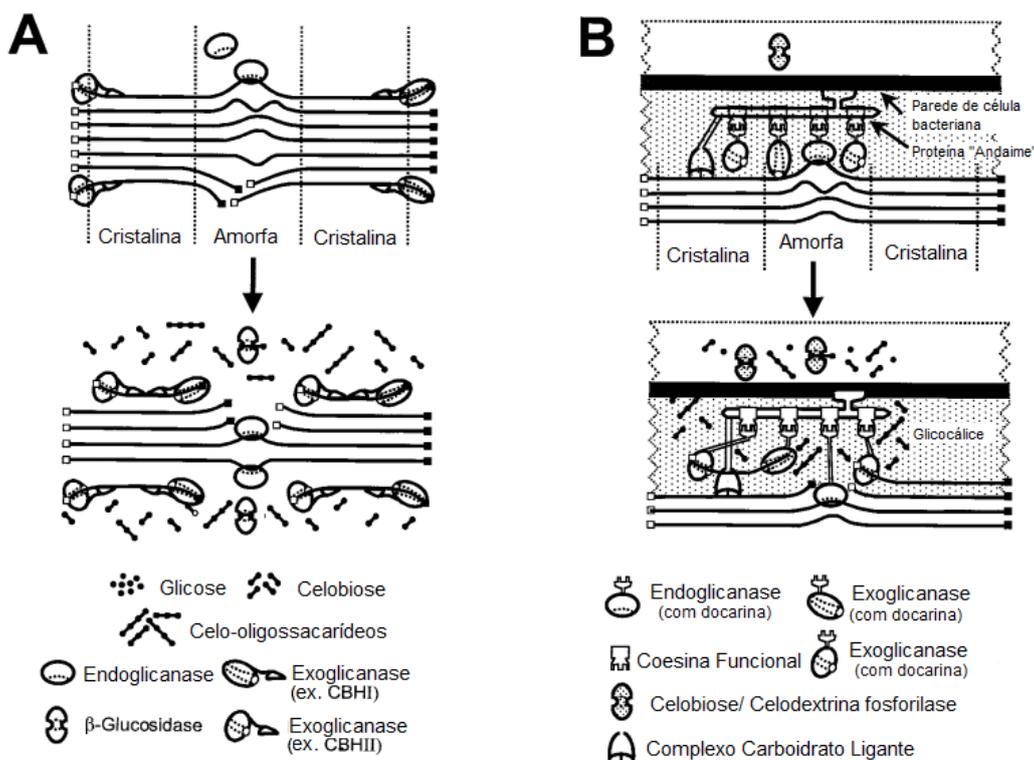


Figura 2- Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexado (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e as não redutoras estão representadas em branco (adaptado de LYND et al., 2002)

As endoglicanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuando randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações  $\beta$ -1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, sendo que sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose (JUHÁSZ et al., 2005; LYND et al., 2002). A carboximetilcelulose é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO e TAN, 2002).

As exoglicanases ou celobiohidrolases atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002). Estas podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores (BON, FERRARA e CORVO, 2008). Possuem ação limitada sobre substratos como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose (SINGH e HAYASHI, 1995).

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglicanases e exoglicanases pela presença deste dímero (PETROVA, BAKALOVA e KOLEV, 2002)

Fatores ambientais e nutricionais são conhecidos por terem marcado efeitos sobre a produção de enzimas microbianas. Guowei et al. (2011), estudaram a influencia de diferentes fatores como concentração de inóculo, sulfato de amônio, Tween, pH e temperatura na produção de celulases por *Trichoderma reesei* HY07 utilizando como principais componentes do meio talo de milho e farelo de trigo. Deswal, Khasa e Kuhad (2011), utilizaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a otimização da produção de enzimas do complexo celulolítico na fermentação em estado sólido com *Fomitopsis* sp. RCK 2010; Jabasingh (2011), também realizou a otimização da produção celulolítica de *Aspergillus nidulans* utilizando palha de coco como substrato, tendo como variáveis a concentração de substrato, pH, umidade inicial e temperatura do processo fermentativo; as mesmas variáveis (pH, umidade e temperatura) também foram otimizadas por Liu et al. (2011) utilizando farelo de arroz como substrato para *Penicillium decumbens* ML-017. A produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas foi estudada por Hiden et al. (2011), empregando palha de arroz submetida a diferentes tratamentos como substrato para *Acremonium cellulolyticus*.

### 3.8 Amilases

O amido é uma mistura de dois polissacarídeos de elevada massa molecular: amilose (15-25%) e amilopectina (75-85%). Essas duas frações apresentam estruturas moleculares que diferem na solubilidade em água, tamanho molecular e suscetibilidade à degradação enzimática. A amilose é um polímero de cadeia linear constituído de unidades de D-glicose na orientação  $\alpha$ . A amilopectina é também um polímero de D-glicose que contém, além das ligações  $\alpha$ -1,4, ramificações com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

A capacidade de utilizar amido como fonte de carbono e energia é amplamente distribuída entre bactérias e fungos. As enzimas capazes de hidrolisar o amido estão entre as mais importantes produzidas em escala industrial. Estas enzimas são amplamente empregadas para a produção comercial de diversos tipos de xaropes de açúcares e de álcool a partir do amido, além de entrarem na formulação de detergentes, entre outras aplicações (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

As enzimas capazes de degradar polissacarídeos atacam a molécula a partir do interior da cadeia (endoenzimas) ou de suas extremidades (exoenzimas). Pertencem à classe das endoamilases, atuando ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações  $\alpha$ -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos. As ligações  $\alpha$ -(1,6) não são quebradas por esta enzima. A ação da  $\alpha$ -amilase sobre a amilose consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose e em seguida uma etapa mais lenta permite a formação de glicose e maltose. A hidrólise da amilopectina pela  $\alpha$ -amilase produz oligossacarídeos contendo ligações  $\alpha$ -(1,6), além de glicose e maltose (GUANDALINI, 2007).

A produção de enzimas amilolíticas vem sendo estudada sob diferentes processos, meios, empregando bactérias ou fungos. Francis et al. (2003), realizaram a otimização dos parâmetros temperatura, umidade inicial e concentração de inóculo na produção de  $\alpha$ -amilase durante fermentação em estado sólido com *Aspergillus oryzae* tendo como principal fonte de carbono resíduos dos grãos após fermentação para produção cerveja ("brewers grain"); este mesmo micro-organismo foi estudado por Sahnoun et al (2012) para isolamento e purificação de duas  $\alpha$ -amilases. A produção de  $\alpha$ -amilase também foi estudada em fermentação submersa com *Chromohalobacter* sp. TVSP 01, avaliando-se o efeito da concentração salina, pH e temperatura na produção enzimática (PRAKASH et al., 2009).

### 3.9 Pectinases

As substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias. Porém, os fungos apresentam maior potencial industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (UENOJO e PASTORE, 2007).

Apesar de a pectina apresentar outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas, ou pectinases, refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico, sendo classificadas em despolimerizantes e desmetoxilantes. As enzimas desmetoxilantes agem removendo grupos metil da cadeia principal, enquanto as enzimas despolimerizantes rompem as ligações  $\alpha$ -1,4 entre monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise quanto por trans-eliminação (SANTI, 2005).

São muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade e melhorar e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação; no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais; na extração de polpa de tomate e no tratamento e degomagem de fibras naturais para a indústria têxtil e de papel (UENOJO e PASTORE, 2007).

Silva et al. (2005) investigaram a produção pectinolítica durante fermentação em estado sólido de *Penicillium viridicatum* em diferentes biorreatores e teores de umidade utilizando como substrato bagasso de laranja e farelo de arroz. Os autores reportaram que nas condições estudadas também foi possível a produção de xilanase, amilase e celulase. Bai et al. (2004) utilizaram como fonte de carbono e nitrogênio, polpa de beterraba e água residuária da produção de glutamato, respectivamente, para produção de pectinase por fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*; sua produção também foi avaliada por este mesmo micro-organismo por Patil e Dayanand (2005) em processo fermentativo em estado sólido e submerso.

### **3.10 Fatores que interferem na atividade enzimática**

A especificidade enzimática reside no fato de que cada estrutura apresenta um centro ativo formado por resíduos de aminoácidos, onde o substrato, que apresenta forma espacial adequada e grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo, possa se ligar. Vários fatores podem interferir na atividade de uma enzima e devem ser cuidadosamente observados para que se tenha um melhor resultado no processo de atuação da mesma. Dentre estes fatores, os mais importantes são pH, temperatura e concentração de substrato (MARZZOCO e TORRES, 1999).

As variações do pH podem exercer muitas alterações nas reações catalisadas por enzimas. Em valores distintos de um pH de funcionalidade, podem ocorrer mudanças na posição de equilíbrio de uma reação. Se o próton  $H^+$  aparecer como reagente ou produto na equação global, por conseqüência, os grupos ionizáveis da enzima (radicais de aminoácidos) interagem com estes prótons, podendo se encontrar tanto na forma protonada quanto desprotonada de forma diferente da conformação nativa levando ao desenrolamento e conseqüente inativação da enzima, o que caracteriza perda de estabilidade (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

A maioria das enzimas exercem sua ação catalítica dentro de limites estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo, que para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0 e no qual a enzima apresenta sua atividade máxima. No entanto, se uma enzima atua em mais de um substrato, os valores de pH ótimo variam. Valores extremos de pH em geral, desnaturam as proteínas, inativando-as (KARLSON e PULIDO, 1967).

Dependendo da temperatura do sistema, as moléculas podem ganhar ou perder energia, alterando seu grau de agitação e muitas vezes perdendo a estabilidade (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

Inicialmente, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada, aumentando assim a formação do complexo enzimático. No entanto, com o aumento contínuo da temperatura poderá ocorrer uma inativação gradativa da enzima, até a total, desnaturando a proteína pelo calor (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

As altas temperaturas influenciam principalmente na velocidade de quebra do complexo enzima-substrato; na afinidade da enzima com ativadores e inibidores e na velocidade de destruição da temperatura. Quando a temperatura do meio aumenta, a velocidade de destruição da enzima é maior que a de catálise. Este efeito pode ser verificado pela equação de Arrhenius, que correlaciona a velocidade de reação e a temperatura absoluta, conforme a Equação 1.

$$k = Ae^{-E_a/RT} \text{ (Eq. 1)}$$

Onde A é a constante pré-exponencial,  $E_a$  é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta.

Esta equação exponencial pode ser trabalhada sob a forma de logaritmo para que se possa obter uma relação linear entre a temperatura e a velocidade de reação (BADIALE-FURLONG, 2000).

Lembrando que as enzimas são termolábeis, ao mesmo tempo que ocorre a reação enzimática de interesse, desenvolve-se também a reação de inativação térmica, sendo que a constante dessa velocidade também é afetada pela temperatura de acordo com a lei de Arrhenius (BORZANI et al., 2001).

O estudo da cinética da reação das enzimas tem por objetivo a compreensão de seu mecanismo de ação e da velocidade das reações por elas catalisadas, avaliando também as alterações na velocidade de reação, em resposta a modificações de parâmetros experimentais. A concentração do substrato [S] é um fator que afeta a velocidade de uma reação enzimática. Em [S] pequenas, a velocidade inicial ( $V_0$ ) é

baixa. Em [S] maiores a  $V_o$  é maior e mais estável. Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual a [S] não altera mais a  $V_o$ , chamada então de velocidade máxima ( $V_{max}$ ). A velocidade da reação deve ser proporcional à concentração do complexo enzima-substrato [ES]. A quebra do ES é o passo limitante da velocidade. Portanto, é necessário conhecer a quantidade adequada de substrato a ser utilizada para a dosagem de uma determinada enzima e esta determinação deve ser realizada quando a enzima estiver atuando em velocidade máxima (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Substrato

Os coprodutos utilizados, farelo e a casca de arroz, foram provenientes das indústrias locais, Irgovel (Indústria Riograndense de Óleos Vegetais Ltda.) e Camil Alimentos, respectivamente. Estes foram acondicionados a -10 °C até a utilização e para o processo fermentativo sua granulometria foi padronizada em 32 mesh.

#### 4.1.2 Micro-organismos

*Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9444, provenientes da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, foram mantidos em meio Ágar Batata a 4°C e repicados a cada 2 meses.

A multiplicação celular foi realizada durante 7 dias a 30°C até a esporulação, para posterior utilização como inóculo no processo fermentativo.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Caracterização físico-química do substrato

O teor de umidade foi determinado empregando gravimetria com secagem em estufa a 105°C de acordo com o método n° 935.29 da Association of Official Analytical Chemists International- AOAC (2000).

Os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo o método 920.85 e a determinação de cinzas por gravimetria, através de incineração das amostras em mufla a 550°C; método n° 923.03; conforme AOAC (2000).

Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-kjeldahl, n° 920.87 e o teor de fibra bruta segundo o método 991.43, ambos da AOAC (2000).

Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença, considerando o somatório dos teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

#### 4.2.2 Padronização método de extração enzimática

Para este estudo foi utilizado o farelo de arroz fermentado (FAF) durante 72 h por *Rhizopus oryzae*. O FAF foi desengordurado sob agitação com éter de petróleo (1:7 p/v) durante 3 h, com troca de solvente a cada 1 h, obtendo-se o farelo de arroz fermentado desengordurado (FAFD).

Foram testados os solventes NaCl aquoso 0,5%, tampão citrato 50 mM pH 4,8 e água destilada sendo empregado em cada 5 g do FAF/FAFD 25 mL do solvente seguido de homogeneização em agitador orbital a 150 rpm durante 30 min e centrifugação a 2300 g a 4°C por 15 min, sendo o precipitado descartado. Ao sobrenadante foi adicionada acetona de forma a manter a proporção de extrato:solvente 1:3, que foram mantidos em repouso a 4°C durante 24 h. O precipitado foi separado por centrifugação a 2300 g a 4°C durante 10 min. Para determinação da atividade enzimática o precipitado foi ressuspensão na solução extratora (20 mL).

Após a escolha do solvente as condições de extração foram estudadas variando a velocidade de agitação e o tempo, conforme descrito na Tabela 4. Estas condições também foram aplicadas ao FAFD.

Tabela 4- Condições estudadas para estabelecimento da extração de celulases da biomassa

Amostra	Velocidade (rpm)	Tempo (min)
FAF	0	30
	150	60
	300	90
FAFD	0	30
	150	60
	300	90

FAF- farelo de arroz fermentado; FAFD- farelo de arroz fermentado e desengordurado.

#### 4.2.3 Determinação de atividade enzimática de carboidrolases

A atividade de endoglicanases foi avaliada pela liberação de açúcares redutores em uma mistura reacional contendo 1 mL de extrato enzimático e 2 mL de carboximetilcelulose 0,5% em tampão citrato 50 mM (pH 4,8) a 50 °C, durante 10 min.

Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de 3,5 dinitrossalicílico (DNS) em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959).

A atividade de celulase total foi avaliada pela liberação de açúcares redutores em uma mistura reacional contendo 1 mL de extrato enzimático e papel filtro Whatman N°1 enrolado (1,0 cm x 6,0 cm = 50 mg) como substrato em tampão citrato 50 mM (pH 4,8) a 50 °C, durante 30 min. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de 3,5 DNS em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade de celulase total e endoglicanases foram definidas como a quantidade ( $\mu\text{mol}$ ) de glicose liberada por min, nas condições do ensaio (GHOSE, 1987).

A atividade de pectinase foi avaliada pela liberação de açúcares em meio reacional contendo o extrato enzimático com 900  $\mu\text{L}$  de solução de pectina 0,5% a 50 °C durante 15 min. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de 3,5 DNS em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade de pectinase foi definida como a quantidade (mg) de ácido galacturônico liberado por min, nas condições do ensaio (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, 2007).

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada pela degradação do amido estimada quantitativamente pelo método iodométrico (BARAJ, GARDA-BUFFON e BADIALE-FURLONG, 2010). O extrato enzimático foi incubado com 0,5 mL de solução de amido solúvel 0,4% em tampão citrato pH 5 0,1 M a 50 °C durante 5 min. A reação de hidrólise foi interrompida com ácido clorídrico (HCl), seguido por adição de solução de iodo (0,3% de  $\text{I}_2$  em solução KI 3%) e água destilada. Após 15 min, o complexo formado teve sua absorvância determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Uma unidade (U) de atividade de amilase foi definida como a quantidade de amido hidrolisado (mg) por min, nas condições do ensaio.

As proteínas extracelulares foram quantificadas pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina (0,05-0,4  $\text{mg mL}^{-1}$ ). A atividade específica foi estimada conforme a Equação 2.

$$\text{Atividade específica: } U/\text{mg}_{\text{proteína}} \text{ (Eq.2)}$$

#### **4.2.4 Efeito de diferentes concentrações de casca de arroz na atividade de carboidrolases**

A fermentação foi realizada em biorreatores de bandeja contendo 30 g de substrato, constituído de casca e farelo de arroz nas proporções de 1, 3 e 5%, distribuído em camadas de 2 cm e autoclavados a 121 °C durante 30 min. Após a esterilização, o meio foi suplementado com 13,5 mL de solução salina contendo (g L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2); MgSO<sub>4</sub> (1); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4) e água destilada estéril para correção da umidade do sistema para 50%. O substrato foi inoculado com suspensão de esporos na concentração de 4x10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup>. Os biorreatores foram incubados a 30 °C durante 5 dias, sendo retirado um biorreator a cada 24 h de fermentação. Para o tempo zero foi realizado o mesmo procedimento descrito, sem a incubação a 30 °C (OLIVEIRA et al., 2010).

As enzimas foram extraídas nas condições padronizadas no item 4.2.2, com NaCl 0,5% na proporção 1:5 (p/v) a 25 °C durante 30 min, seguido por centrifugação a 2300 g a 4 °C por 15 min, sendo o precipitado descartado. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de acetona para manter uma proporção de extrato: solvente 1:3, que foram mantidos em repouso a 4 °C durante 24 h. O precipitado foi separado por centrifugação a 2300 g a 4 °C. Para determinação da atividade enzimática, conforme o item 4.2.3, o precipitado foi ressuspenso na solução extratora (20 mL).

#### **4.2.5 Estimativa do crescimento microbiano e teor de açúcares redutores no meio**

O crescimento microbiano foi determinado através da estimativa do teor de glicosamina, conforme Aiddo, Hendry e Wood (1981). Para tal, 5 mL de HCl 6 M foram adicionadas a biomassa seca, seguido de aquecimento a 100 °C, durante 2 h. Ao extrato obtido foi adicionada a solução de acetil-acetona; seguida de aquecimento em banho de água fervente por 20 min. Após o resfriamento foi adicionado etanol e o reagente de Erlich (2,67 g DAB- p\_dimetilaminobenzaldeído- dissolvido em 15 mL de etanol e 15 mL de ácido clorídrico), mantendo-se a 65 °C em estufa durante 10 min. Para determinação da n-acetilglicosamina foram determinadas as unidades de absorvância em espectrofotômetro a 530 nm com curva padrão de glicosamina (0,8-17,6 µg/mL).

Os açúcares redutores foram extraídos da biomassa com água na proporção 1:10 (p/v) a 50 °C durante 30 min, seguido de centrifugação a 2300 g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi clarificado com as soluções de Carrez I (ferrocianeto de potássio 15%) e Carrez II (sulfato de zinco 30%) e após centrifugação, os açúcares redutores contidos no sobrenadante foram determinados através da reação com o ácido 3,5 DNS a 100 °C durante 5 min empregando uma curva padrão de glicose (0,01 e 0,1mg mL<sup>-1</sup>) para quantificação (MILLER, 1959).

#### **4.2.6 Otimização da produção de enzimas celulolíticas empregando casca de arroz como substrato**

##### a) Planejamento experimental

A produção de celulase total e endoglicanase durante fermentação em estado sólido com *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei* foi realizada utilizando planejamentos experimentais seqüenciais. A primeira etapa consistiu na definição dos níveis das variáveis (teor de casca e umidade inicial) utilizadas, empregando delineamentos compostos centrais 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central. A segunda etapa consistiu em um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, com triplicata no ponto central, tendo como variáveis independentes a concentração de casca e o teor de umidade inicial.

O processo fermentativo para ambos os micro-organismos foi realizado em erlenmeyes a 150 rpm e 30 °C, sendo o teor de umidade inicial e a composição do substrato determinados de acordo com os planejamentos experimentais. O substrato (15 g) foi acondicionado nos biorreatores; seguido de autoclavagem a 121 °C por 15 min. Após, foram adicionados a solução nutriente contendo (g.L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (13), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (3), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3), CaCl<sub>2</sub> (3), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,0156), CoCl<sub>2</sub> (0,002), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,014), a solução de esporos com concentração inicial de 4x10<sup>6</sup> esporos.g<sup>-1</sup> e água estéril para correção da umidade. A fermentação ocorreu durante 24 h a 30 °C.

A extração enzimática foi realizada em NaCl 0,5% a 25 °C durante 30 min, seguido de centrifugação a 2300 g a 4 °C por 15 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado como extrato bruto para medição enzimática de acordo com o item 4.2.3. Os resultados de atividade específica de celulase total e endoglicanase foram avaliados através de variância (ANOVA), com um nível de confiança de 5%,

sendo calculados os efeitos estimados e os coeficientes de regressão dos modelos gerados.

#### b) Biorreatores e solução nutriente

O processo fermentativo para ambos os micro-organismo foi realizado como descrito anteriormente, variando-se o tipo de biorreator utilizado (bandeja e erlenmeyer) e a solução nutriente (sem nutrientes; solução A: descrita no item 4.2.6; solução B: descrita no item 4.2.4), durante 24 h a 30 °C.

A extração enzimática foi realizada conforme descrito no item 4.2.6 e as atividades de celulase total e endoglicanase foram determinadas conforme descrito no item 4.2.3. A atividade relativa foi determinada de acordo com a Equação 3.

$$\text{Atividade relativa (\%)}: \frac{\text{Atividade específica}}{\text{Atividade específica}_{\max}} \times 100 \text{ (Eq.3)}$$

Onde:

Atividade específica: atividade encontrada em cada condição

Atividade específica<sub>max</sub>: atividade encontrada na melhor condição

#### 4.2.7 Cinética de produção enzimática

Tendo em vista as condições estabelecidas nas fermentações anteriores, foi acompanhada a cinética de produção enzimática por um período de 45 h para *Rhizopus oryzae* e 75 h para *Trichoderma reesei* à 30 °C, sendo realizadas amostragens a cada 5 h nas primeiras 25 h e a cada 10 h nos intervalos posteriores.

As amostras foram analisadas determinando-se as atividades de endoglicanase, celulase total, amilase, pectinase, teor de glicosamina e de açúcares redutores.

Os parâmetros produtividade e produtividade específica foram calculados conforme Equações 4 e 5, respectivamente.

$$\text{Produtividade (U.g}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}: \frac{\text{Atividade}_t - \text{Atividade}_{\text{zero}}}{t_f} \text{ (Eq. 4)}$$

$$\text{Produtividade específica (U.mg}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}: \frac{\text{Produtividade}}{\text{GLC} - \text{GLC}_{\text{zero}}} \text{ (Eq.5)}$$

Onde:

Atividade<sub>t</sub>- atividade enzimática em U.g<sup>-1</sup> em determinado tempo de fermentação.

Atividade<sub>zero</sub>- atividade enzimática em U.g<sup>-1</sup> no tempo zero.

t<sub>r</sub>- tempo de fermentação em h.

GLC- teor de glucosamina em determinado tempo de fermentação.

GLC<sub>zero</sub>- teor de glucosamina no tempo zero.

#### 4.2.8 Caracterização bioquímica das atividades celulolíticas

##### a) Temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através das atividades das enzimas celulase total e endoglicanase, em tampão sódio-citrato pH 4,8 50 mM, nas temperaturas de 10, 20, 40, 60 e 80 °C, conforme o item 4.2.3. Os dados normatizados foram calculados conforme a Equação 3.

##### b) pH ótimo

Foi estudada a influência do pH na atividade de celulase total e endoglicanase a 60 °C, utilizando os tampões acetato de sódio 50 mM, pH 3,0; 4,0; citrato de sódio 50 mM, 5,0; 6,0; tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 ; Tris HCl 50 mM pH 8,0, conforme o item 4.2.3. Os dados normatizados foram calculados conforme a Equação 3.

##### c) Estabilidade térmica

O estudo da termoestabilidade da endoglicanase e de celulase total foi realizado incubando o extrato bruto nas temperaturas de 25, 60, 80 e 100 °C durante 10 h. A atividade residual foi medida nas condições ótimas de temperatura e pH para reação, a cada hora.

Levando em consideração que em altas temperaturas a cinética de desnaturação é de 1º ordem, pode ser obtida a Equação 6:

$$\frac{d[E]}{dt} = K_d[E] \text{ (Eq. 6)}$$

Integrando a Equação 6, considerando na equação de velocidade  $K_d$  constante quando a temperatura é mantida constante, obtêm-se a Equação 7 :

$$\ln\left(\frac{V}{V_0}\right) = -K_d t \text{ (Eq.7)}$$

Graficando-se  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo, determina-se o valor de  $K_d$ , constante da velocidade de desnaturação enzimática. Com este resultado, calcula-se o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas, definido como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial, conforme a Equação 8.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{K_d} \text{ (Eq.8)}$$

A constante da velocidade desta reação ( $K_d$ ) também é afetada pela temperatura de acordo com a lei de Arrhenius, conforme a Equação 9:

$$K_d = A e^{-E_d/RT} \text{ (Eq.9)}$$

Linearizando a Equação 9, obtêm-se a Equação 10:

$$\ln(K_d) = -\frac{E_d}{R} \frac{1}{T} + \ln(A) \text{ (Eq.10)}$$

A partir da Equação de Arrhenius linearizada, através da inclinação da reta determina-se a energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ).

#### d) Parâmetros cinéticos da endoglicanase

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  a atividade de endoglicanase foi avaliada em diferentes concentrações iniciais de substrato. O efeito da concentração do substrato na atividade pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Mentem (Equação 11).

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \text{ (Eq. 11)}$$

Linearizando-se a equação de Michaelis- Mentem, obtêm-se a Equação 12:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \text{ (Eq. 12)}$$

Através dos coeficientes angular e linear da Equação 12, foram obtidos os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente. O valor de  $K_M$  corresponde a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade máxima enzimática (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química dos substratos

A produção enzimática realizada em cultivo celular pode ser induzida pela presença de nutrientes no substrato. Neste caso, a proposta foi empregar co-produto e resíduo da indústria arroseira, farelo e casca, que foram primeiramente caracterizados quanto aos componentes maiores. A Tabela 5 apresenta os resultados da composição proximal dos substratos escolhidos para o estudo da fermentação em estado sólido (FES). Os resultados foram avaliados estatisticamente quanto a significância das diferenças entre os componentes da casca e do farelo de arroz.

Tabela 5- Composição proximal dos substratos (casca e farelo de arroz)

Frações (%)	F.A.I	C.A
Umidade	9,9±0,1 <sup>a</sup>	9,3±0,1 <sup>a</sup>
Proteína	12,7±0,6 <sup>a</sup>	2,7±0,1 <sup>a</sup>
Cinzas	10,5±0,4 <sup>b</sup>	16,2±0,1 <sup>a</sup>
Lipídios	21,3±0,3 <sup>a</sup>	0,9±0,1 <sup>a</sup>
Fibras	6,9±0,8 <sup>b</sup>	43,6±0,6 <sup>b</sup>
Carboidratos *	38,7± 0,1 <sup>a</sup>	27,3± 0,1 <sup>a</sup>

\* Carboidratos estimados por diferença. Média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa  $p < 0,05$ . F.A.I- farelo de arroz integral. C.A- casca de arroz.

Os teores dos diferentes componentes determinados no farelo e casca de arroz estão dentro da faixa descrita na literatura (DAL MORO, ROSA e HOELZEL, 2004; NITZKE e BIEDRZYCKI, 2011). Cabe salientar que o maior teor lipídico do farelo de arroz decorre do fato de ter sido empregado farelo de arroz não desengordurado que usualmente é empregado para a extração de óleo.

O teor de fibras encontrado para a casca de arroz foi 6 vezes superior ao farelo, confirmando o potencial para ser empregada como substrato para a produção de enzimas do complexo celulolítico por FES. Estudos realizados por Graminha et al. (2008) demonstraram que a fibra deste material é composta por 35% de celulose, 35% de hemicelulose e 17% de lignina, que também corrobora para a escolha da casca para produção deste complexo enzimático.

## 5.2 Padronização do método de extração do complexo celulolítico

A recuperação de produtos de fermentação exige a sua extração do meio sólido fermentado com solventes adequados ou soluções específicas sob determinadas condições de agitação, tempo e temperatura (MACIEL et al., 2009).

Este procedimento corresponde a primeira etapa de *downstream* e sua preparação dependerá se a enzima é extra ou intracelular. Para as enzimas intracelulares há a necessidade do rompimento celular, que pode ser feita utilizando métodos mecânicos, como agitação, e para isto, algumas vezes, é necessário um pré-tratamento, como remoção de gorduras (BORZANI et al., 2001). Esta atua como interferente durante a extração, causando turbidez no extrato obtido. Agitação excessiva pode causar formação de espuma com conseqüente alteração na estrutura espacial da enzima causada pelos efeitos mecânicos (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, 2009).

Com base nisso, o estudo das condições ideais de extração das enzimas do complexo celulolítico foi realizado avaliando-se a influência do tipo de solvente, tempo e velocidade de agitação em temperatura ambiente (25°C) na atividade enzimática.

O emprego de tampão citrato, estudado por Mekala et al. (2008); Martins et al. (2008), neste trabalho proporcionou uma extração significativamente maior de proteínas da biomassa (Tabela 6); no entanto, a atividade obtida tanto para endoglicanases quanto para celulase total, foi significativamente inferior quanto comparado aos demais solventes extratores utilizados.

As soluções salina e aquosa apresentaram atividades celulolíticas superiores, porém não diferiram estatisticamente entre si. Portanto, a solubilização das proteínas em solução salina foi adotada pelo fato de que este solvente, além de melhorar a estabilidade da estrutura protéica, também pode auxiliar na estabilização da atividade enzimática (BON, FERRARA e CORVO, 2008). Além deste fato, pode-se observar que a fração globulina, apresenta maior atividade catalítica das enzimas de interesse, pois é necessária menor concentração protéica para obtenção da mesma atividade enzimática quando utilizada a extração com água destilada.

Tabela 6- Solvente extrator e a atividade de celulase total e endoglicanase da biomassa

Solvente	Proteína solúvel (mg.g <sup>-1</sup> )	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
NaCl 0,5%	19,5±0,3 <sup>c</sup>	0,124±0,001 <sup>a</sup>	0,073±0,007 <sup>a</sup>
Tampão citrato	37,1 ±0,4 <sup>a</sup>	0,108±0,002 <sup>b</sup>	0,049±0,001 <sup>b</sup>
Água destilada	23,5±0,6 <sup>b</sup>	0,126±0,006 <sup>a</sup>	0,075±0,003 <sup>a</sup>

Média±desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

O efeito da velocidade e tempo de agitação na extração do complexo celulolítico (Tabela 7) indicou que o micro-organismo (*Rhizopus oryzae*) produziu enzimas extracelulares, pois a maior atividade específica para ambas as enzimas estudadas foi encontrada de um modo geral, sem agitação da biomassa usando solução de NaCl 0,5%. A atividade celulolítica dos extratos não diferiu significativamente quando eles foram submetidos a 30, 60 e 90 min de agitação durante a extração.

O farelo de arroz fermentado apresentou atividade enzimática aproximadamente 1,6 vezes superior quando comparado ao farelo de arroz fermentado desengordurado, nos experimentos sem agitação. Este resultado foi também relatado por Zeng et al. (2006), que empregaram agentes surfactantes para aumentar a estabilidade das proteínas e favorecer a ação enzimática. No caso deste estudo, os lipídios presentes na biomassa poderiam ter atuado como surfactante, visto que estavam presentes no substrato antes do processo.

Tabela 7 – Efeito da velocidade e tempo de agitação na extração das celulasas da biomassa

Condições		FAFD		FAF	
Agitação (rpm)	Tempo (min)	Celulase total (U mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Endoglicanase (U mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase total (U mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Endoglicanase (U mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
0	30	0,061±0,004 <sup>b</sup>	0,122±0,001 <sup>abd</sup>	0,099±0,001 <sup>a</sup>	0,196±0,008 <sup>a</sup>
0	60	0,063±0,004 <sup>b</sup>	0,113±0,001 <sup>de</sup>	0,075±0,001 <sup>c</sup>	0,192±0,003 <sup>a</sup>
0	90	0,066±0,006 <sup>b</sup>	0,120±0,003 <sup>bd</sup>	0,112±0,001 <sup>a</sup>	0,196±0,006 <sup>a</sup>
150	30	0,083±0,008 <sup>a</sup>	0,107±0,001 <sup>ce</sup>	0,075±0,003 <sup>c</sup>	0,133±0,010 <sup>b</sup>
150	60	0,087±0,004 <sup>a</sup>	0,132±0,001 <sup>a</sup>	0,051±0,009 <sup>b</sup>	0,133±0,010 <sup>b</sup>
150	90	0,083±0,005 <sup>a</sup>	0,126±0,006 <sup>ab</sup>	0,075±0,004 <sup>c</sup>	0,128±0,006 <sup>b</sup>
300	30	0,069±0,001 <sup>b</sup>	0,115±0,006 <sup>de</sup>	0,073±0,003 <sup>c</sup>	0,118±0,003 <sup>b</sup>
300	60	0,061±0,003 <sup>b</sup>	0,109±0,004 <sup>ce</sup>	0,071±0,011 <sup>bc</sup>	0,113±0,002 <sup>b</sup>
300	90	0,058±0,003 <sup>b</sup>	0,102±0,003 <sup>c</sup>	0,066±0,023 <sup>bc</sup>	0,171±0,001 <sup>a</sup>

Média±desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). FAF- farelo de arroz fermentado. FAFD- farelo de arroz fermentado desengordurado.

Com base nos resultados definidos anteriormente, foi escolhido para extração do complexo celulolítico solução de NaCl 0,5% que ficava em contato com a biomassa durante 30 min a 25 °C, sem necessidade de agitação. Deste modo, este trabalho propõe uma metodologia de extração enzimática que não necessita gasto de energia, nem de reagentes para o desengorduramento da amostra.

### 5.3 Efeito de diferentes concentrações de casca de arroz na atividade celulolítica

Desde os primeiros trabalhos de secreção de celulasas por micro-organismos tem sido observado que estas são enzimas do tipo induzidas ou adaptativas, e que naturalmente, a própria celulose é a substância indutora (SEHNEM et al., 2006; CAMASSOLA e DILLON, 2010; SAID e PIETRO, 2004). Considerando a abundância da casca de arroz e sua riqueza em celulose (35%) foi avaliado o efeito da sua concentração na produção celulolítica durante fermentação com *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) e *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) (Tabela 8 e 9, respectivamente). Cabe salientar que o primeiro micro-organismo foi isolado do próprio arroz, o que faz supor que ele é capaz de recuperar nutrientes a partir desta matriz. Para tal a produção de

celulase seria uma ferramenta importante para romper a barreira da casca e atingir as porções mais internas ou mesmo usar a própria celulose como fonte de carbono.

Tabela 8- Produtividade de endoglucanase e celulase total durante fermentação com *Rhizopus oryzae*

Tempo (h)	Teor de casca de arroz					
	1%		3%		5%	
	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
24	2,44±0,01 <sup>aB</sup>	2,96±0,07 <sup>a1</sup>	2,18±0,08 <sup>aC</sup>	3,01±0,02 <sup>a1</sup>	2,81±0,03 <sup>aA</sup>	1,42±0,05 <sup>a2</sup>
48	0,73±0,01 <sup>bB</sup>	0,96±0,02 <sup>b2</sup>	0,66±0,01 <sup>bC</sup>	1,22±0,02 <sup>b1</sup>	1,26±0,01 <sup>bA</sup>	0,74±0,05 <sup>b3</sup>
72	0,58±0,03 <sup>cA</sup>	0,72±0,08 <sup>c1</sup>	0,45±0,01 <sup>cB</sup>	0,54±0,01 <sup>c2</sup>	0,64±0,05 <sup>cA</sup>	0,33±0,03 <sup>c3</sup>
96	0,34±0,01 <sup>dB</sup>	0,34±0,06 <sup>d1</sup>	0,28±0,01 <sup>dC</sup>	0,27±0,04 <sup>d1</sup>	0,50±0,04 <sup>dA</sup>	0,29±0,01 <sup>cd1</sup>
120	0,37±0,01 <sup>dB</sup>	0,33±0,01 <sup>d1</sup>	0,22±0,01 <sup>dC</sup>	0,12±0,01 <sup>e3</sup>	0,47±0,01 <sup>dA</sup>	0,23±0,01 <sup>d2</sup>

Média+desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa na coluna. Letras maiúsculas e números indicam diferença significativa na linha para endoglucanase e celulase total (p<0,05). U- unidade de atividade. g- gramas de biomassa seca. d- dias.

Tabela 9- Produtividade de endoglucanase e celulase total durante fermentação com *Trichoderma reesei*

Tempo (h)	Teor de casca de arroz					
	1%		3%		5%	
	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
24	0,92±0,09 <sup>aB</sup>	0,22±0,01 <sup>a2</sup>	1,75±0,12 <sup>aA</sup>	0,51±0,02 <sup>a1</sup>	1,10±0,01 <sup>aB</sup>	0,14±0,03 <sup>a3</sup>
48	0,54±0,01 <sup>bB</sup>	0,19±0,10 <sup>b1</sup>	0,63±0,01 <sup>bA</sup>	0,07±0,01 <sup>b2</sup>	0,32±0,02 <sup>bC</sup>	-0,03±0,01 <sup>c3</sup>
72	0,39±0,01 <sup>cB</sup>	0,05±0,02 <sup>d1</sup>	0,48±0,01 <sup>cA</sup>	0,06±0,01 <sup>b1</sup>	0,35±0,02 <sup>bC</sup>	0,01±0,01 <sup>d2</sup>
96	0,31±0,01 <sup>cA</sup>	0,08±0,01 <sup>c1</sup>	0,33±0,01 <sup>dA</sup>	0,05±0,01 <sup>b2</sup>	0,15±0,01 <sup>cB</sup>	0,01±0,00 <sup>cd3</sup>
120	0,34±0,01 <sup>cA</sup>	0,07±0,01 <sup>cd1</sup>	0,20±0,01 <sup>dB</sup>	0,01±0,00 <sup>c3</sup>	0,13±0,03 <sup>cC</sup>	0,03±0,01 <sup>d2</sup>

Média+desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa na coluna. Letras maiúsculas e números indicam diferença significativa na linha para endoglucanase e celulase total (p<0,05). U- unidade de atividade. g- gramas de biomassa seca. d- dias.

De acordo com os resultados expressos nas Tabelas 8 e 9, a maior produtividade para ambas as enzimas em todas as condições estudadas ocorreu em

24 h de fermentação. Com relação ao efeito das diferentes concentrações de casca utilizada, pode-se observar que não ocorreu uma tendência definida do aumento da produção com o aumento do teor de casca, indicando a necessidade de maiores concentrações de casca no meio para o aumento da atividade enzimática.

A maior atividade específica de celulase total foi obtida utilizando 3% de casca, com valores de 0,153 e 0,078 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> correspondente a 3,55 e 1,41 U.g<sub>meio</sub><sup>-1</sup> para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente. Para endoglucanases os resultados mais promissores foram obtidos com 5% de casca, 0,128 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, correspondente a 2,95 U.g<sub>meio</sub><sup>-1</sup> na fermentação como *R. oryzae* e 3% de casca, 0,156 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, correspondente a 1,88 U g<sub>meio</sub><sup>-1</sup>, durante fermentação com *T. reesei*. Mostrando que o primeiro produz complexo enzimático com frações possuidoras de atividade exocelular e para polímeros diversos.

Latifian et al. (2007), encontraram valores máximos de 1,16 U g<sub>meio</sub><sup>-1</sup> ao utilizar farelo de arroz como substrato para fermentação de *T. reesei* QM9414. Também Chandra, Viswanath e Reddy (2007) reportaram utilizando farelo de arroz como substrato para crescimento de *Aspergillus niger*, atividade de celulase total máxima de 1,5 U. g<sub>meio</sub><sup>-1</sup> durante 72 h de fermentação, portanto inferiores ao encontrado neste trabalho. No entanto, a atividade de endoglucanase foi menor que a encontrada por Murashima et al. (2002) para duas endoglucanases extraídas de *R. oryzae*, cujos valores foram 272,5 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para a enzima RCE1 e 257,8 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para a RCE2. No entanto, cabe ressaltar que os autores submeteram estas endoglucanases a diferentes processos de purificação e no presente trabalho só foi realizada a etapa de extração e purificação primária, visto que o interesse é a aplicação do complexo a menor custo possível para liberar açúcares e porções menores de polímeros indigeríveis da casca.

Apesar das diferenças de produção enzimática nas fermentações, foi observado que o tempo necessário para a obtenção da maior atividade específica coincidia para todas as condições estudadas, sendo este de 24 h. Para a endoglucanase produzida por *T. reesei* a atividade manteve-se praticamente constante entre 24 e 72 h de cultivo. Outros autores relataram a necessidade de maiores tempos de fermentação para obtenção de atividade celulolítica, tais como 72 h para *Aspergillus niger* em farelo de arroz, trigo e serragem (CHANDRA, VISWANATH e REDDY, 2007) e 144 h com *Fusarium oxysporum* em palha de milho (PANAGIOTOU et al., 2003). Dados que demonstram que o procedimento e os microorganismos usados neste trabalho são muito promissores, pois períodos prolongados

de fermentação acarretam maiores riscos de contaminação e custo para ampliação de escala.

A avaliação produção de enzimas amilolíticas e pectinolíticas (Tabelas 10 e 11) durante o processo fermentativo também foi realizada, pois os substratos contêm outras fontes de carbono além de celulose.

Tabela 10- Produtividade de amilase e pectinase durante fermentação com *Rhizopus oryzae*

Tempo (h)	Teor de casca de arroz					
	1%		3%		5%	
	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
24	0,11±0,01 <sup>aB</sup>	2,13±0,02 <sup>a1</sup>	0,26±0,01 <sup>aA</sup>	1,61±0,01 <sup>a2</sup>	0,25±0,01 <sup>aA</sup>	1,36±0,07 <sup>a3</sup>
48	0,06±0,01 <sup>bB</sup>	0,72±0,04 <sup>b1</sup>	0,13±0,01 <sup>bA</sup>	0,74±0,08 <sup>b1</sup>	0,13±0,01 <sup>bA</sup>	0,66±0,09 <sup>b1</sup>
72	0,05±0,01 <sup>cB</sup>	0,61±0,03 <sup>c1</sup>	0,09±0,01 <sup>cA</sup>	0,52±0,01 <sup>c1</sup>	0,09±0,01 <sup>cA</sup>	0,47±0,16 <sup>b1</sup>
96	0,04±0,01 <sup>dC</sup>	0,39±0,03 <sup>d1</sup>	0,06±0,01 <sup>dB</sup>	0,34±0,03 <sup>d1</sup>	0,08±0,01 <sup>dA</sup>	0,59±0,51 <sup>b1</sup>
120	0,03±0,01 <sup>eB</sup>	0,33±0,02 <sup>e1</sup>	0,05±0,01 <sup>eA</sup>	0,22±0,01 <sup>e1</sup>	0,05±0,01 <sup>eA</sup>	0,28±0,09 <sup>b1</sup>

Média+desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa na coluna. Letras maiúsculas e números indicam diferença significativa na linha para amilase e pectinase (p<0,05). U- unidade de atividade. g- gramas de biomassa seca. d- dias.

Tabela 11- Produtividade de amilase e pectinase durante fermentação com *Trichoderma reesei*

Tempo (h)	Teor de casca de arroz					
	1%		3%		5%	
	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Amilase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.g <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
24	0,17±0,01 <sup>aA</sup>	-0,26±0,17 <sup>a2</sup>	0,09±0,02 <sup>aB</sup>	0,31±0,01 <sup>a1</sup>	0,10±0,01 <sup>aB</sup>	0,20±0,06 <sup>b1</sup>
48	0,12±0,01 <sup>bA</sup>	-0,03±0,02 <sup>b2</sup>	0,08±0,01 <sup>aB</sup>	-0,02±0,09 <sup>b2</sup>	0,06±0,01 <sup>bC</sup>	0,31±0,02 <sup>a1</sup>
72	0,06±0,01 <sup>cA</sup>	-0,02±0,01 <sup>b1</sup>	0,04±0,01 <sup>bC</sup>	-0,04±0,01 <sup>b1</sup>	0,05±0,01 <sup>dB</sup>	0,03±0,05 <sup>c1</sup>
96	0,06±0,01 <sup>cA</sup>	-0,07±0,04 <sup>ab2</sup>	0,03±0,01 <sup>bC</sup>	-0,02±0,01 <sup>b2</sup>	0,04±0,01 <sup>dB</sup>	0,08±0,02 <sup>c1</sup>
120	0,05±0,01 <sup>cA</sup>	-0,01±0,04 <sup>b1</sup>	0,02±0,01 <sup>bC</sup>	-0,02±0,02 <sup>b1</sup>	0,03±0,01 <sup>cB</sup>	0,06±0,02 <sup>c1</sup>

Média+desvio padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa na coluna. Letras maiúsculas e números indicam diferença significativa na linha para amilase e pectinase (p<0,05). U- unidade de atividade. g- gramas de biomassa seca. d- dias.

A produção de amilase por *Rhizopus oryzae* apresentou comportamento semelhante as do complexo celulolítico, apresentando uma produtividade máxima em 24 h. Para *Trichoderma reesei* quanto maior a quantidade de casca no meio, menor a atividade de  $\alpha$ -amilase. Tal comportamento pode ser explicado pela presença da casca no meio, que pode favorecer a produção de celulases; possivelmente enzimas que iniciam a hidrólise do substrato, para posterior atuação de outras enzimas carboidrolíticas.

A produção de pectinase durante fermentação com *R. oryzae* praticamente não foi afetada pelas variações da concentração de casca no meio, tendo maior produtividade em 24 h. O mesmo não ocorreu ao utilizar *T. reesei* como agente fermentador, pois nas concentrações de 1 e 3% de casca a atividade enzimática diminuiu com o aumento do tempo de fermentação (Tabela 11) possivelmente devido a predominância das enzimas do complexo celulolítico ou pela própria degradação enzimática durante a produção da biomassa.

O teor de açúcares redutores liberados no meio foi acompanhado, conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 12 – Produção de açúcares redutores no meio fermentativo

Tempo (h)	Açúcar redutor ( $\text{mg}_{\text{glicose}} \cdot \text{g}^{-1}$ )					
	<i>T. reesei</i>			<i>R. oryzae</i>		
	1% casca	3% casca	5% casca	1% casca	3% casca	5% casca
0	2,93 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	1,29 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	10,27 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	3,97 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	6,04 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>
24	13,00 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	11,03 $\pm$ 0,25 <sup>d</sup>	5,54 $\pm$ 0,17 <sup>d</sup>	35,60 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	26,05 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	35,18 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>
48	8,31 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	10,61 $\pm$ 0,20 <sup>de</sup>	5,71 $\pm$ 0,14 <sup>cd</sup>	2,73 $\pm$ 0,17 <sup>e</sup>	1,77 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	3,68 $\pm$ 0,27 <sup>d</sup>
72	10,54 $\pm$ 0,15 <sup>e</sup>	8,50 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	8,17 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	3,25 $\pm$ 0,02 <sup>de</sup>	2,45 $\pm$ 0,03 <sup>de</sup>	3,12 $\pm$ 0,21 <sup>d</sup>
96	10,31 $\pm$ 0,09 <sup>e</sup>	10,06 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>	7,98 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	4,18 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	2,55 $\pm$ 0,30 <sup>d</sup>	1,33 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
120	12,03 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	7,59 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	5,91 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	5,88 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	0,98 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	3,89 $\pm$ 0,68 <sup>d</sup>

Média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

A liberação de açúcares para o meio fermentativo está possivelmente vinculada a ação das enzimas celulolíticas, pois o pico de produção coincide com o tempo necessário para a obtenção da maior produtividade enzimática de endoglucanase, celulase total, amilase e pectinase (somente para *Rhizopus*) neste caso de 24 h. Depois o açúcar liberado pode ser utilizado para obtenção de energia ou constituição dos componentes celulares das estruturas fúngicas.

Comportamento similar foi encontrado por Iyayi (2004), que reportaram a redução no conteúdo de celulose e aumento no teor de açúcares na biomassa em 336 h de fermentação com *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* De acordo com Bon, Ferrara e Corvo (2008), a produção de enzimas durante a fermentação pode ou não estar relacionada com o crescimento do micro-organismo. Com base nisso, foi determinado como indicativo de multiplicação fúngica o teor de glicosamina (Figuras 3 e 4).

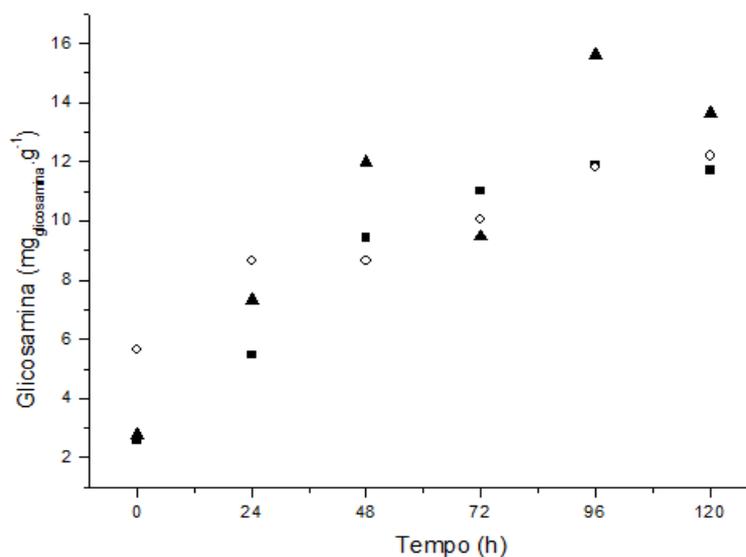


Figura 3- Produção de glicosamina durante fermentação de *R. oryzae* em meio contendo 1% (○), 3% casca (■) e 5% (▲) de casca.

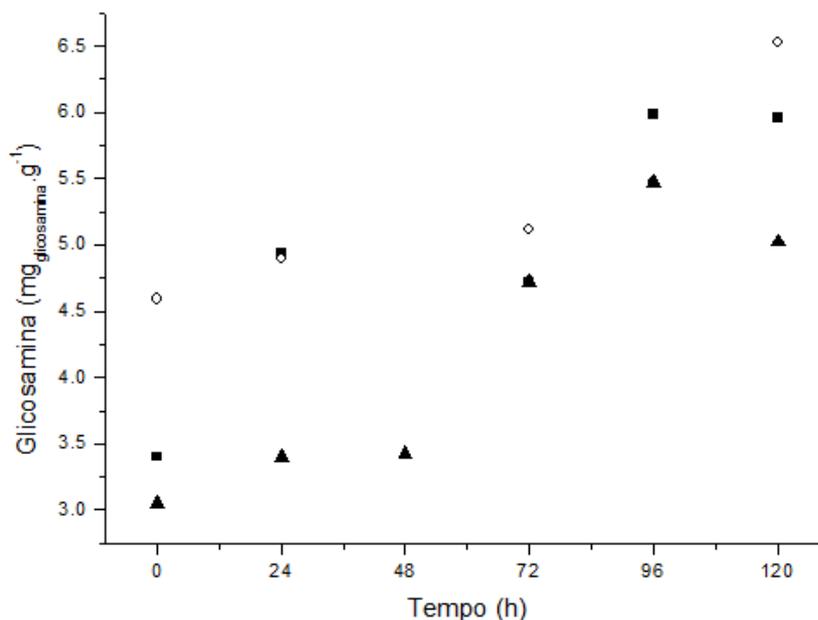


Figura 4- Produção de glicosamina durante fermentação de *T. reesei* em meio contendo 1% (○), 3% casca (■) e 5% (▲) de casca.

Como pode ser observado nas Figuras 3 e 4, é possível afirmar que há relação entre a obtenção de enzimas celulolíticas e a multiplicação dos micro-organismos estudados, pois a fase exponencial coincidiu com as maiores atividades específicas determinadas.

A regressão exponencial da fase de crescimento foi realizada para determinação da velocidade ( $\mu$ ), sendo obtidos valores em torno de 0,04 e 0,002 h<sup>-1</sup> para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente. Isto indica que nas condições utilizadas, *R. oryzae* apresentou multiplicação mais rápida que *T. reesei*, podendo conseqüentemente produzir as enzimas de interesse em um período menor de cultivo. Esse comportamento pode ser explicado em função da classificação de cada micro-organismo, pois *R. oryzae* é um fungo zigomiceto, possuindo hifas cenocíticas que facilitam sua multiplicação enquanto que *T. reesei* é um ascomiceto e o fato de seus esporos sexuais ficarem armazenados em células (ascos) que ocasiona uma menor taxa de esporulação (PELCZAR et al., 2010). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que as concentrações de casca de arroz estudadas 1,3 e 5% não propiciaram um aumento relativo na atividade das enzimas celulolíticas, provavelmente devido a quantidade de farelo de arroz no meio, que não é propício para produção celulolítica devido a grande quantidade de amido. No entanto, mostrou a capacidade do *R. oryzae* produzir o complexo celulolítico de forma eficiente. Esse fato norteou o estudo da

utilização de casca de arroz como principal fonte de carbono para produção deste complexo enzimático.

Nesse estudo foi realizada a otimização da produção de enzimas celulolíticas para ambos os micro-organismos, adotando-se o tempo de 24h de fermentação, correspondente a máxima produtividade obtida. Cabe salientar que a partir dessa etapa serão realizadas determinações no extrato bruto para futuramente serem estudadas as condições ideais de purificação.

#### **5.4 Otimização da produção das enzimas: endoglicanase e celulase total**

Para o estudo da otimização de produção de enzimas celulolíticas, realizou-se Delineamentos Compostos Centrais (DCC) e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como respostas a atividade específica de endoglicanase e celulase total. As variáveis independentes foram teor de casca e umidade inicial no meio tanto para *R. oryzae* quanto para *T. reesei*.

Para melhor compreensão dos resultados serão apresentados os dados referentes a otimização durante o cultivo de cada micro-organismo separadamente.

##### ***R. oryzae***

A Tabela 13 apresenta a matriz do primeiro DCC com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total. Os resultados para a endoglicanase variaram de 0,060 a 0,083 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> enquanto que para celulase total foram de 0,026 a 0,034 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>. Quanto maior o teor de casca (70%) e menor a umidade inicial (45%), maior atividade das enzimas celulolíticas, de acordo com o ensaio 3.

Tabela 13- Matriz do primeiro DCC 2<sup>2</sup> para processo fermentativo com *R. oryzae*

Ensaio	Umidade (X <sub>1</sub> ) (%)	Casca (X <sub>2</sub> ) (%)	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
1	-1 (45)	-1 (20)	0,062	0,027
2	1 (75)	-1(20)	0,060	0,026
3	-1 (45)	1 (70)	0,083	0,034
4	1 (75)	1 (70)	0,066	0,028
5	0 (60)	0 (45)	0,076	0,034
6	0 (60)	0 (45)	0,075	0,034
7	0 (60)	0 (45)	0,076	0,033

O efeito estimado do teor de umidade (X<sub>1</sub>) e de casca (X<sub>2</sub>) indicou a influência de cada variável na atividade específica das enzimas celulolíticas. Os valores em destaque na Tabela 14 representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática.

Tabela 14- Efeitos sobre a atividade específica (U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>) para o primeiro DCC 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

Enzima	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	p
Endoglicanase	<b>Média</b>	<b>0,071</b>	<b>0,071</b>	<b>0,0002</b>	<b>326,02</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,0006</b>	<b>-16,45</b>	<b>0,0040</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)</b>	<b>0,007</b>	<b>0,014</b>	<b>0,0006</b>	<b>23,38</b>	<b>0,0020</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,004</b>	<b>-0,008</b>	<b>0,0006</b>	<b>-12,99</b>	<b>0,0060</b>
Celulase Total	<b>Média</b>	<b>0,031</b>	<b>0,031</b>	<b>0,0002</b>	<b>141,41</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,002</b>	<b>-0,004</b>	<b>0,0006</b>	<b>-6,06</b>	<b>0,0260</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)</b>	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>	<b>0,0006</b>	<b>7,79</b>	<b>0,0160</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,001</b>	<b>-0,003</b>	<b>0,0006</b>	<b>-4,33</b>	<b>0,0050</b>

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância.

Quanto maior a magnitude do valor t no teste de Student e menor o valor de p, mais significativa é o coeficiente (JABASINGH e VALLINACHIYAR, 2011).

O aumento no teor de casca aumentou a atividade específica em 0,014 e 0,005 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, enquanto que a maior umidade inicial ocasionou uma redução da atividade em 0,010 e 0,004 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para endoglicanase e celulase total,

respectivamente. A combinação das variáveis apresentou efeito negativo na atividade de endoglicanase ( $0,008 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) e celulase total ( $0,003 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ).

As menores atividades celulolíticas foram encontradas nos ensaios correspondentes a 75% de umidade inicial. Esta tendência pode ser explicada pelo fato que em teores de umidade elevados (aproximadamente 80%) ocorre dificuldade de crescimento micelial em direção às camadas mais inferiores do substrato sólido, forçando o fungo a se desenvolver nas camadas mais superficiais do substrato, portanto não há necessidade de produção de celulase para romper as barreiras em camadas mais profundas de celulose (ALEXANDRINO et al., 2007).

Os modelos para as atividades específicas não foram significativos e nem preditivos, não sendo possível a construção das superfícies de respostas, pois o valor obtido para o coeficiente de correlação foi baixo e o  $F_{\text{calculado}}$  foi inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$  (Tabela 15).

Tabela 15 - ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o primeiro DCC 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	$F_{\text{calculado}}$
Endoglicanase	Regressão	3	0,000329	0,000110	3,05
	Resíduo	3	0,000108	0,000036	
	Falta de ajuste	1	0,000107		
	Erro puro	2	0,000001		
	Total	6	0,000437		
	$R^2$		0,753		$F_{\text{tab } 3;3;0,05} = 9,28$
Celulase Total	Regressão	3	0,000039	0,000013	0,92
	Resíduo	3	0,000042	0,000014	
	Falta de ajuste	1	0,000041		
	Erro puro	2	0,000001		
	Total	6	0,000081		
	$R^2$		0,479		$F_{\text{tabelado } (3;3;0,05)} = 9,28$

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

Os resultados deste planejamento indicaram que é necessário um aumento no teor de casca no meio e diminuição da umidade inicial, sendo realizado o segundo DCC com estas alterações. Comportamento que indica que a produção celulolítica é induzida pela presença de celulose e que os fungos filamentosos são capazes de se

multiplicar em baixa atividade de água (SINGHANIA et al.,2010). A Tabela 16 apresenta os valores reais e codificados para este planejamento e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total.

Tabela 16- Matriz do segundo DCC 2<sup>2</sup> para processo fermentativo com *R. oryzae*

Ensaio	Umidade (X <sub>1</sub> ) (%)	Casca (X <sub>2</sub> ) (%)	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
1	-1 (25)	-1 (60)	0,065	0,030
2	1 (50)	-1(60)	0,045	0,019
3	-1 (25)	1 (90)	0,099	0,047
4	1 (50)	1 (90)	0,059	0,035
5	0 (37,5)	0 (75)	0,052	0,024
6	0 (37,5)	0 (75)	0,054	0,025
7	0 (37,5)	0 (75)	0,050	0,024

Os valores para as atividades específicas variaram de 0,045 a 0,099 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> e de 0,019 a 0,047 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para endoglicanase e celulase total, respectivamente. A condição experimental que propiciou a maior atividade enzimática foi a do ensaio 3 (25% de umidade e 90% de casca), comprovando o relatado por Singhanian et al. (2010), como citado anteriormente.

O efeito estimado das variáveis X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> bem como a interações das mesmas estão representadas na Tabela 17, destacando-se os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática.

Tabela 17- Efeitos sobre a atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o segundo DCC 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

Enzima	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	p
Endoglicanase	<b>Média</b>	<b>0,061</b>	<b>0,061</b>	<b>0,0009</b>	<b>66,08</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,015</b>	<b>-0,030</b>	<b>0,0024</b>	<b>-12,18</b>	<b>0,0060</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)</b>	<b>0,012</b>	<b>0,024</b>	<b>0,0024</b>	<b>9,93</b>	<b>0,0100</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,0024</b>	<b>-4,13</b>	<b>0,0530</b>
Celulase Total	<b>Média</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,029</b>	<b>0,000032</b>	<b>907,05</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,0060</b>	<b>-0,012</b>	<b>0,000085</b>	<b>-140,90</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,017</b>	<b>0,000085</b>	<b>196,37</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,0004</b>	<b>-0,001</b>	<b>0,000085</b>	<b>-9,58</b>	<b>0,0110</b>

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância.

O comportamento evidenciado na Tabela 17 foi similar ao encontrado no primeiro planejamento realizado. O aumento do teor de umidade inicial e de casca ocasionaram uma diminuição na atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) de 0,030 e 0,012 e um aumento de 0,024 e 0,017 para endoglicanase e celulase total, respectivamente. A combinação das variáveis apresentou efeito negativo na atividade de endoglicanase ( $0,010 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) bem como para celulase total ( $0,001 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ).

Apesar do coeficiente de correlação ter aumentado em relação ao primeiro planejamento, não foi possível a geração das superfícies de resposta, pois o modelo obtido para esses resultados não foram preditivos devido ao  $F_{\text{calculado}}$  ter sido inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$  (Tabela 18).

Tabela 18- ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o segundo DCC 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F <sub>calculado</sub>
Endoglicanase	Regressão	3	0,001567	0,00052	4,11
	Resíduo	3	0,000379	0,00013	
	Falta de ajuste	1	0,000367		
	Erro puro	2	0,000012		
	Total	6	0,001946		
	$R^2$	0,805		$F_{\text{tab } 3;3;0,05} = 9,28$	
Celulase Total	Regressão	3	0,000421	0,000140	3,68
	Resíduo	3	0,000113	0,000038	
	Falta de ajuste	1	0,000113		
	Erro puro	2	0,000000		
	Total	6	0,000534		
	$R^2$	0,789		$F_{\text{tabelado } (3;3;0,05)} = 9,28$	

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

A partir deste planejamento foi realizado o DCCR, aumentando-se o teor de casca no meio e diminuindo a umidade inicial. A Tabela 19 apresenta os valores reais e codificados para este planejamento e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total.

Tabela 19- Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> para processo fermentativo com *R. oryzae*

Ensaio	Umidade (X <sub>1</sub> ) (%)	Casca (X <sub>2</sub> ) (%)	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
1	-1 (20)	-1 (70)	0,072	0,056
2	1 (40)	-1(70)	0,199	0,048
3	-1 (20)	1 (95)	0,027	0,042
4	1 (40)	1 (95)	0,128	0,044
5	0 (30)	- α (65)	0,120	0,030
6	0 (30)	α (100)	0,089	0,034
7	-α (16)	0 (82,5)	0,024	0,029
8	α (44,1)	0 (82,5)	0,081	0,027
9	0 (30)	0 (82,5)	0,207	0,040
10	0 (30)	0 (82,5)	0,205	0,039
11	0 (30)	0 (82,5)	0,203	0,041

α=1,414.

Os valores para atividade de endoglicanase variaram de 0,027-0,207 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, apresentando como melhor condição o ponto central (30% de umidade e 82,5% de casca). A atividade de celulase total variou de 0,027-0,056 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, apresentando o maior valor no ensaio 1 ( 20% umidade e 70% de casca).

O efeito estimado do teor de umidade (X<sub>1</sub>) e casca (X<sub>2</sub>) para os parâmetros lineares (L) e quadrático (Q) indicou a influência de cada variável na atividade específica das enzimas celulolíticas. Os valores em destaque na Tabela 20 representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática.

Tabela 20- Efeitos sobre a atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o DCCR 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	P
Endoglicanase	<b>Média</b>	<b>0,205</b>	<b>0,205</b>	<b>0,0013</b>	<b>158,26</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(L)</b>	<b>0,038</b>	<b>0,077</b>	<b>0,0016</b>	<b>48,65</b>	<b>0,0004</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(Q)</b>	<b>-0,070</b>	<b>-0,139</b>	<b>0,0019</b>	<b>-73,34</b>	<b>0,0002</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(L)</b>	<b>-0,020</b>	<b>-0,040</b>	<b>0,0016</b>	<b>-24,94</b>	<b>0,0016</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(Q)</b>	<b>-0,043</b>	<b>-0,087</b>	<b>0,0019</b>	<b>-45,78</b>	<b>0,0005</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,006</b>	<b>-0,013</b>	<b>0,0022</b>	<b>-5,74</b>	<b>0,0291</b>
Celulase Total	<b>Média</b>	<b>0,0401</b>	<b>0,0401</b>	<b>0,0006</b>	<b>65,58</b>	<b>0,0002</b>
	Umidade (X <sub>1</sub> )(L)	-0,0010	-0,0021	0,0008	-2,74	0,1112
	Umidade (X <sub>1</sub> )(Q)	-0,0017	-0,0034	0,0009	-3,79	0,0631
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(L)</b>	<b>-0,0015</b>	<b>-0,0031</b>	<b>0,0008</b>	<b>-4,12</b>	<b>0,0542</b>
	Casca (X <sub>2</sub> )(Q)	0,0003	0,0006	0,0009	0,70	0,5567
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>0,0025</b>	<b>0,0051</b>	<b>0,0010</b>	<b>4,77</b>	<b>0,0413</b>

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância. L- linear, Q-quadrático.

Para endoglicanase, todos os parâmetros foram significativos, sendo que somente a umidade (linear) apresentou um efeito positivo na atividade específica; portanto um acréscimo do nível -1 para +1 proporcionou um aumento de 0,077  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ . Para celulase total, o teor de casca apresentou um valor *p* próximo da significância (0,0542) e por isso esta interação foi considerada significativa, sendo incluída no modelo matemático, sendo que um aumento no teor de casca proporcionou uma diminuição na atividade específica de 0,0031  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ . A interação entre as variáveis também foi significativa.

Para a verificação do modelo matemático foi realizado uma análise de variância (Tabela 21), considerando apenas os efeitos significativos.

Tabela 21- ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o DCCR 2<sup>2</sup> de *R. oryzae*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F <sub>calculado</sub>
Endoglicanase	Regressão	5	0,045642	0,0091	9,16
	Resíduo	5	0,004967	0,0010	
	Falta de ajuste	3	0,004957		
	Erro puro	2	0,000010		
	Total	10	0,050609		
	R <sup>2</sup>	0,902		F <sub>tabelado (5;5;0,05)</sub> -5,05	
Celulase Total	Regressão	2	0,000045	0,000023	0,26
	Resíduo	8	0,000713	0,000089	
	Falta de ajuste	6	0,000711		
	Erro puro	2	0,000002		
	Total	10	0,000758		
	R <sup>2</sup>	0,059		F <sub>tabelado (5;5;0,05)</sub> - 5,05	

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

A ANOVA (Tabela 21) demonstrou que a regressão foi significativa ao nível de 95% de confiança, evidenciando que o modelo explicou 90% da variação dos dados experimentais.

A partir da análise de variância, verificou-se que o  $F_{\text{calculado}}$  foi 1,8 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ . Alguns autores afirmam que para ser preditivo o  $F_{\text{calculado}}$  deve ser de 3 a 5 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (KALIL, MAUGERI e RODRIGUES, 2000), porém como o estudo está relacionado a um processo fermentativo para obtenção de enzimas, o modelo foi considerado preditivo, sendo possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 5). Estas figuras mostraram a região de otimização das variáveis em relação à atividade de endoglicanase e ajudam a entender a relação entre a resposta e os níveis experimentais de cada variável. Estes gráficos também mostram o tipo de interação entre as variáveis testadas e ajudam a obter as condições ótimas (JABASINGH e VALLINACHIYAR, 2011).

O modelo de segunda ordem, com a atividade enzimática em função da umidade inicial e do teor de casca no meio fermentativo está descrito na Equação 13.

$$\text{Endoglucanase (U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}\text{)}: 0,205 + 0,038X_1 - 0,070X_1^2 - 0,020X_2 - 0,043X_2^2 - 0,006X_1X_2$$

(Eq.13)

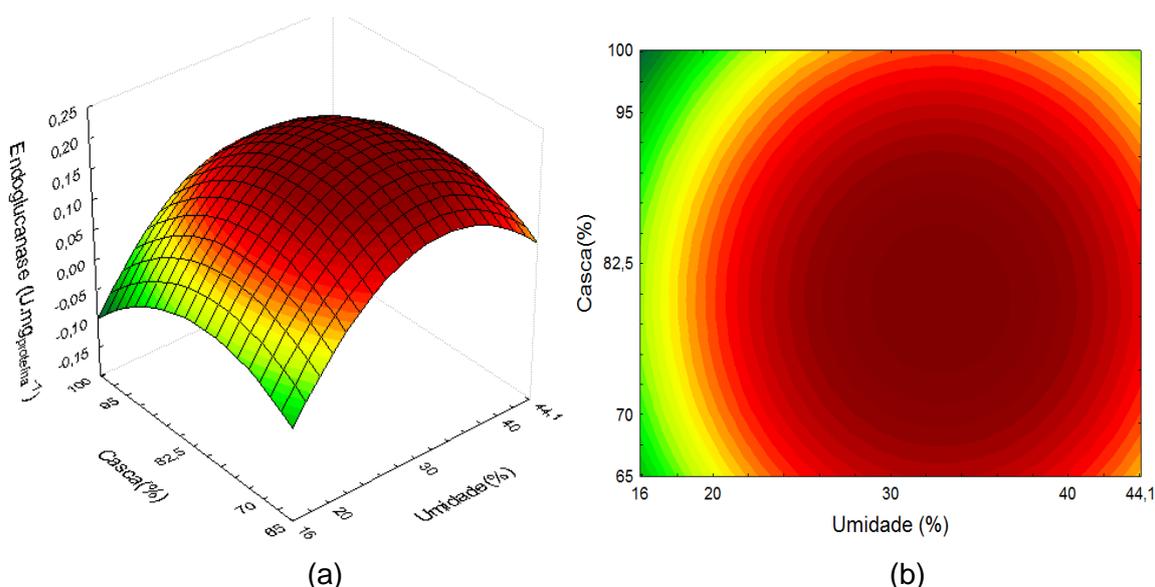


Figura 5- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de endoglicanase por *R. oryzae* em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%).

Pode-se observar que a região de otimização em vermelho escuro, (Figura 5), correspondeu ao ponto central do planejamento, nas condições de 30% de umidade e 82,5% de casca para endoglicanase e será utilizada para o estudo da cinética de produção enzimática de *R. oryzae*, pois para celulase total não foi possível a obtenção de um modelo significativo e preditivo.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que ocorreu um aumento de 3,5 vezes na atividade enzimática de endoglicanase através da utilização das técnicas de planejamento experimental e que a atividade enzimática decresce para valores de umidade superior a 65%, podendo ser devido ao decréscimo da porosidade, alterações na estrutura da partícula e baixa transferência de oxigênio, conforme relatado por Santos et al. (2008). Com relação ao teor de casca, pode se observar que a concentração da fonte de carbono apresenta uma influencia significativa devido à presença de celulose, conforme relatado por Vinha et al. (2011).

***T. reesei***

Considerando-se que o trabalho previa comparação da produção de enzimas celulolíticas pelos dois micro-organismos (*T. reesei* e *R. oryzae*), os valores das variáveis para o primeiro DCC foram os mesmos utilizados para *R. oryzae*.

A Tabela 22 apresenta a matriz do primeiro DCC com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total. Os valores de atividade específica variaram de 0,018 a 0,077 e de 0,016 a 0,039 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para endoglicanase e celulase total, respectivamente. O ensaio 3 foi o que propiciou a maior atividade específica, tendo como condições 45% de umidade e 70% de casca, comportamento semelhante ao encontrado no estudo com *R. oryzae*.

Tabela 22- Matriz do primeiro DCC 2<sup>2</sup> para processo fermentativo com *T. reesei*

Ensaio	Umidade (X <sub>1</sub> ) (%)	Casca (X <sub>2</sub> ) (%)	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
1	-1 (45)	-1 (20)	0,061	0,030
2	1 (75)	-1 (20)	0,021	0,015
3	-1 (45)	1 (70)	0,077	0,039
4	1 (75)	1 (70)	0,018	0,016
5	0 (60)	0 (45)	0,043	0,021
6	0 (60)	0 (45)	0,041	0,025
7	0 (60)	0 (45)	0,044	0,024

O efeito estimado das variáveis X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> bem como as suas interações estão representadas na Tabela 23, destacando-se os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática.

Tabela 23- Efeitos sobre a atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o primeiro DCC 2<sup>2</sup> de *T. reesei*

Enzima	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	p
Endoglicanase	<b>Média</b>	<b>0,043</b>	<b>0,043</b>	<b>0,0006</b>	<b>67,18</b>	<b>0,0002</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,0017</b>	<b>-29,31</b>	<b>0,0012</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,007</b>	<b>0,0017</b>	<b>4,10</b>	<b>0,0548</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,009</b>	<b>0,0017</b>	<b>-5,47</b>	<b>0,0318</b>
Celulase Total	<b>Média</b>	<b>0,024</b>	<b>0,024</b>	<b>0,0007</b>	<b>32,37</b>	<b>0,0010</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)</b>	<b>-0,009</b>	<b>-0,019</b>	<b>0,0020</b>	<b>-9,53</b>	<b>0,0108</b>
	Casca (X <sub>2</sub> )	0,003	0,005	0,0020	2,64	0,1180
	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,002	-0,004	0,0020	-2,16	0,1631

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância.

Para a endoglicanase, o aumento da umidade apresentou uma diminuição na atividade enzimática de  $0,050 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ , enquanto que o aumento do teor de casca propiciou um acréscimo de  $0,007 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ . A interação das variáveis apresentou um efeito negativo na atividade enzimática. Este comportamento era esperado, pois teores elevados de umidade podem causar uma diluição da enzima. O teor de casca apresentou um valor *p* próximo da significância (0,0548) e por isso esta interação foi considerada significativa, sendo incluída no modelo matemático.

Para celulase total somente a variável umidade foi significativa ( $p < 0,05$ ), sendo o seu acréscimo responsável por uma diminuição de  $0,019 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ , podendo este ser explicado pelo fato de alta atividade de água causar redução da troca de gases durante processo fermentativo (MAHANTA, GUPTA e KHARE, 2008).

Para a verificação da significância do modelo matemático foi realizado uma análise de variância (Tabela 24), considerando apenas os efeitos significativos.

Tabela 24- ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o primeiro DCC 2<sup>2</sup> de *T. reesei*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F <sub>calculado</sub>
Endoglicanase	Regressão	3	0,002643	0,000881	240
	Resíduo	3	0,000011	0,000004	
	Falta de ajuste	1	0,000005		
	Erro puro	2	0,000006		
	Total	6	0,002654		
		R <sup>2</sup>	0,996		F <sub>tab 3;3;0,05</sub> 9,28
Celulase Total	Regressão	1	0,000356	0,000356	28,7
	Resíduo	5	0,000062	0,000012	
	Falta de ajuste	3	0,000054		
	Erro puro	2	0,000008		
	Total	6	0,000418		
		R <sup>2</sup>	0,852		F <sub>tabelado (1;5;0,05)</sub> 6,60

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

A análise de variância (Tabela 24) mostrou que o modelo de regressão para a atividade de endoglicanase foi preditivo, pois o  $F_{\text{calculado}}$  (240) apresentou um valor 26 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (9,28). O coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) mostrou que 99,6% da variação na resposta foi explicada pela função estimada.

Para celulase total, o modelo de regressão também foi preditivo, apresentando um  $F_{\text{calculado}}$  (28,7) 4,3 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (6,60). O coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) mostrou que 85,2% da variação na resposta foi explicada pela função estimada.

Com os valores de coeficientes de regressão obtidos pela análise, os modelos obtidos para as duas enzimas apresentaram as seguintes equações:

$$\text{Endoglucanase (U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}\text{): } 0,043 - 0,025X_1 + 0,003X_2 - 0,006X_1X_2 \text{ (Eq.14)}$$

$$\text{Celulase Total (U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}\text{): } 0,024 - 0,009X_1 \text{ (Eq.15)}$$

Os modelos foram preditivos e significativos possibilitando a construção das superfícies de respostas e curvas de contorno (Figura 6 e 7).

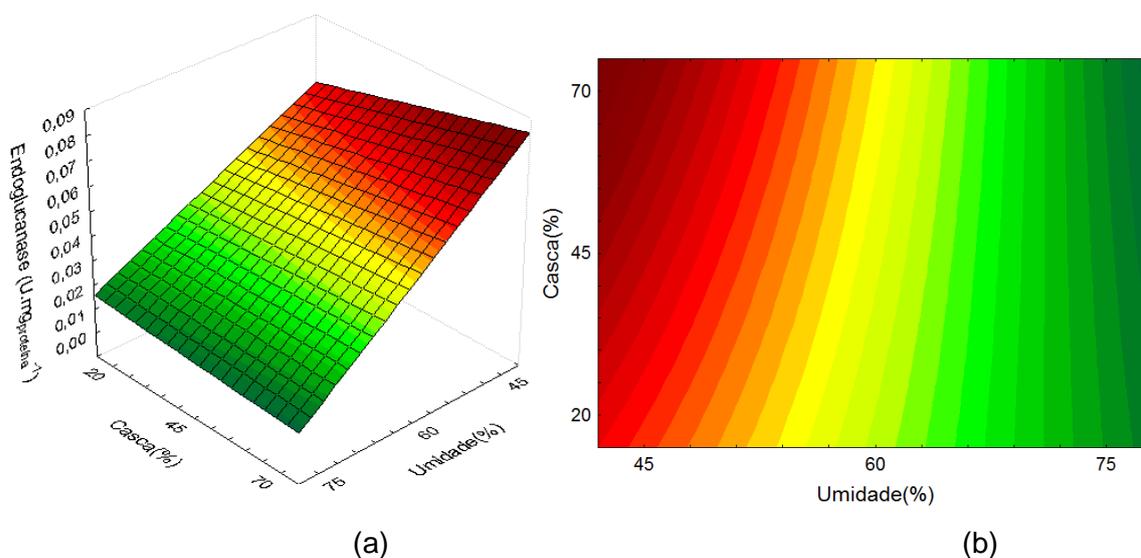


Figura 6- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade específica de endoglicanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no primeiro DCC de *T. reesei*.

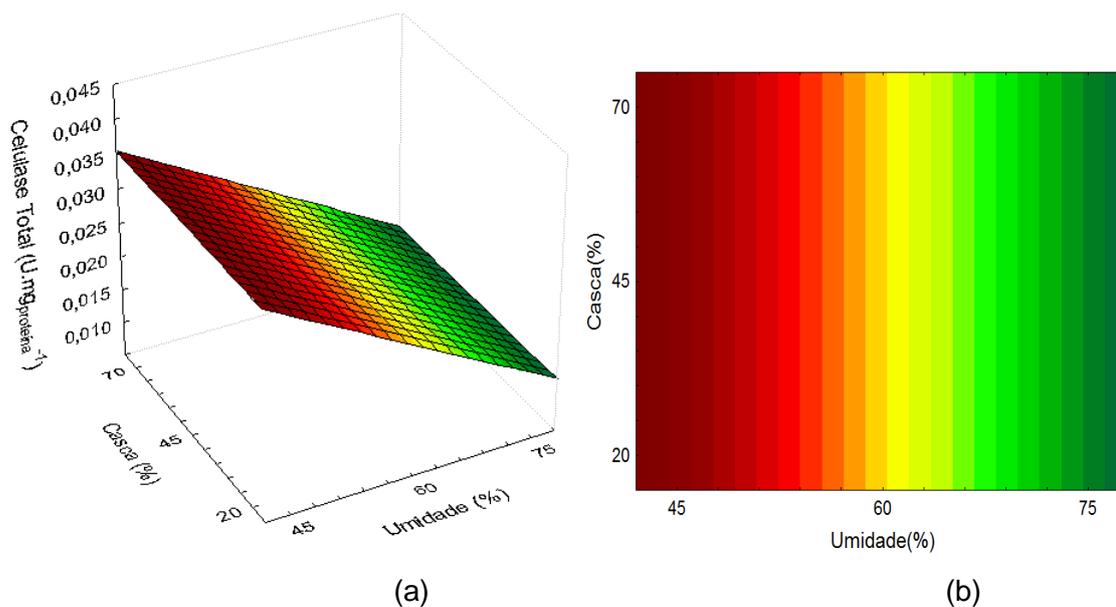


Figura 7- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no primeiro DCC de *T. reesei*.

A maior atividade específica da endoglicanase foi verificada na maior concentração de casca e menor teor de umidade (Figura 6). O teor de casca não influenciou a atividade de celulase total (Figura 7), no entanto quanto menor o teor de umidade inicial, melhor o resultado obtido. Assim, as superfícies de resposta indicaram que a concentração de casca deve ser incrementada e o teor de umidade inicial

diminuído para que sejam obtidas as condições otimizadas para produção de enzimas celulolíticas.

A Tabela 25 apresenta a matriz do segundo DCC com os valores reais, codificados e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total. Os valores de atividade específica variaram de 0,058 a 0,089 e de 0,041 a 0,059  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$  para endoglicanase e celulase total, respectivamente, apresentando valores superiores ao encontrado no planejamento anterior. O ensaio 4 foi o que propiciou a maior atividade específica, tendo como condições os maiores teores de umidade inicial e casca.

Tabela 25- Matriz do segundo DCC  $2^2$  para processo fermentativo com *T. reesei*

Ensaio	Umidade ( $X_1$ ) (%)	Casca ( $X_2$ ) (%)	Endoglicanase ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ )	Celulase Total ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ )
1	-1 (25)	-1 (60)	0,071	0,046
2	1 (50)	-1(60)	0,058	0,041
3	-1 (25)	1 (90)	0,071	0,057
4	1 (50)	1 (90)	0,089	0,059
5	0 (37,5)	0 (75)	0,082	0,056
6	0 (37,5)	0 (75)	0,078	0,057
7	0 (37,5)	0 (75)	0,080	0,056

O efeito estimado das variáveis e sua interação estão representados na Tabela 26, destacando-se os coeficientes de regressão com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática.

Tabela 26- Efeitos sobre a atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o primeiro DCC 2<sup>2</sup> de *T. reesei*.

Enzima	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	p
	<b>Média</b>	<b>0,075</b>	<b>0,075</b>	<b>0,0006</b>	<b>128,51</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Endoglicanase	Umidade ( $X_1$ )	0,001	0,002	0,0016	1,40	0,2964
	<b>Casca (<math>X_2</math>)</b>	<b>0,008</b>	<b>0,016</b>	<b>0,0016</b>	<b>10,12</b>	<b>0,0096</b>
	<b><math>X_1X_2</math></b>	<b>0,008</b>	<b>0,015</b>	<b>0,0016</b>	<b>9,86</b>	<b>0,0101</b>
	<b>Média</b>	<b>0,053</b>	<b>0,053</b>	<b>0,0003</b>	<b>198,06</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Celulase Total	Umidade ( $X_1$ )	-0,006	-0,001	0,0007	-1,71	0,2291
	<b>Casca (<math>X_2</math>)</b>	<b>0,007</b>	<b>0,015</b>	<b>0,0007</b>	<b>20,47</b>	<b>0,0024</b>
	<b><math>X_1X_2</math></b>	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>0,0007</b>	<b>4,87</b>	<b>0,0396</b>

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância.

Para ambas as enzimas a variável umidade não foi significativa, enquanto que um aumento no teor de casca propiciou um acréscimo nas atividades de endoglicanase e celulase total de 0,016 e 0,015  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ , respectivamente.

Para a verificação da significância do modelo matemático foi realizado uma análise de variância (Tabela 27) com a resposta atividade específica de endoglicanase e celulase total para as variáveis estudadas, considerando apenas os efeitos significativos.

Tabela 27- ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o segundo DCC 2<sup>2</sup> de *T. reesei*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F <sub>calculado</sub>
Endoglicanase	Regressão	2	0,000480	0,000240	7,93
	Resíduo	4	0,000121	0,000030	
	Falta de ajuste	2	0,000116		
	Erro puro	2	0,000005		
	Total	6	0,000601		
	R <sup>2</sup>	0,800		F <sub>tab (2;4;0,05)</sub> - 6,94	
Celulase Total	Regressão	2	0,000223	0,000112	8,45
	Resíduo	4	0,000053	0,000013	
	Falta de ajuste	2	0,000052		
	Erro puro	2	0,000001		
	Total	6	0,000276		
	R <sup>2</sup>	0,808		F <sub>tabelado (2;4;0,05)</sub> - 6,94	

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

O valor de F<sub>calculado</sub> para endoglicanase e celulase total de 7,93 e 8,45, respectivamente e o F<sub>tabelado</sub> de 6,94 (Tabela 27). O coeficiente de determinação do modelo (R<sup>2</sup>) mostrou que aproximadamente 80% da variação nas respostas foram explicadas pelas funções estimadas. Apesar dos valores de F<sub>calculado</sub> serem próximos ao tabelado e o coeficiente de determinação dos modelos não ser tão elevado, por tratar-se de um estudo de produção enzimática; além da avaliação dos resultados ao nível de 95% de confiança, os modelos caracterizados pelas Equações 16 e 17 foram considerados significativos e preditivos.

$$\text{Endoglicanase (U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}\text{): } 0,075 + 0,008X_2 + 0,008X_1X_2 \text{ (Eq.16)}$$

$$\text{Celulase Total (U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}\text{): } 0,053 + 0,007X_2 + 0,002X_1X_2 \text{ (Eq.17)}$$

Assim, os modelos para as atividades específicas de endoglicanase e celulase total foram utilizados para construir as superfícies de respostas (Figuras 8 e 9).

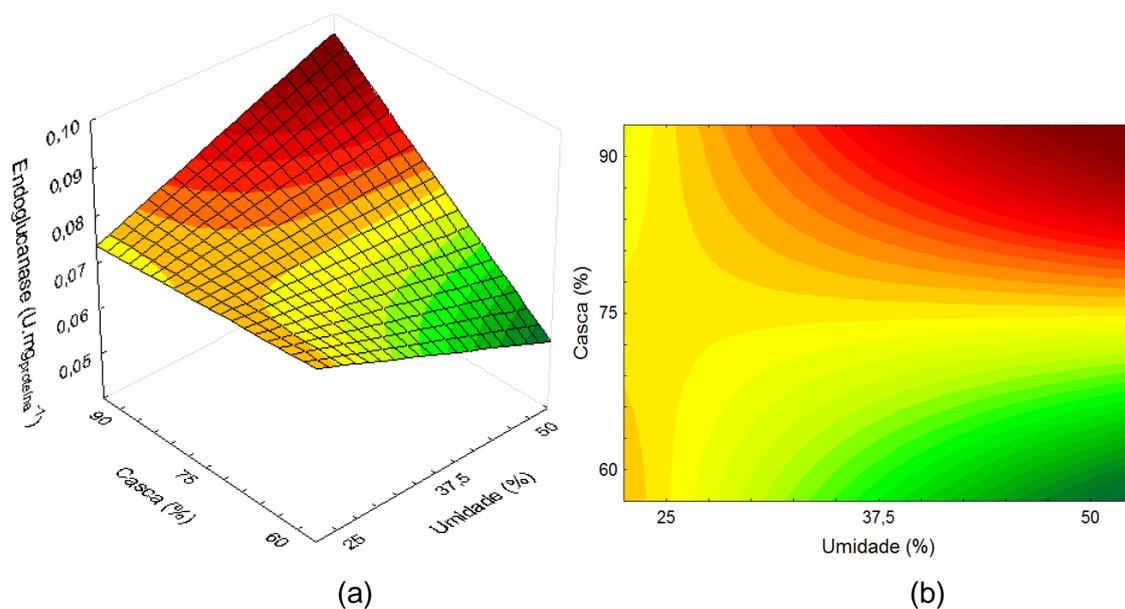


Figura 8- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de endoglicanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no segundo DCC de *T. reesei*.

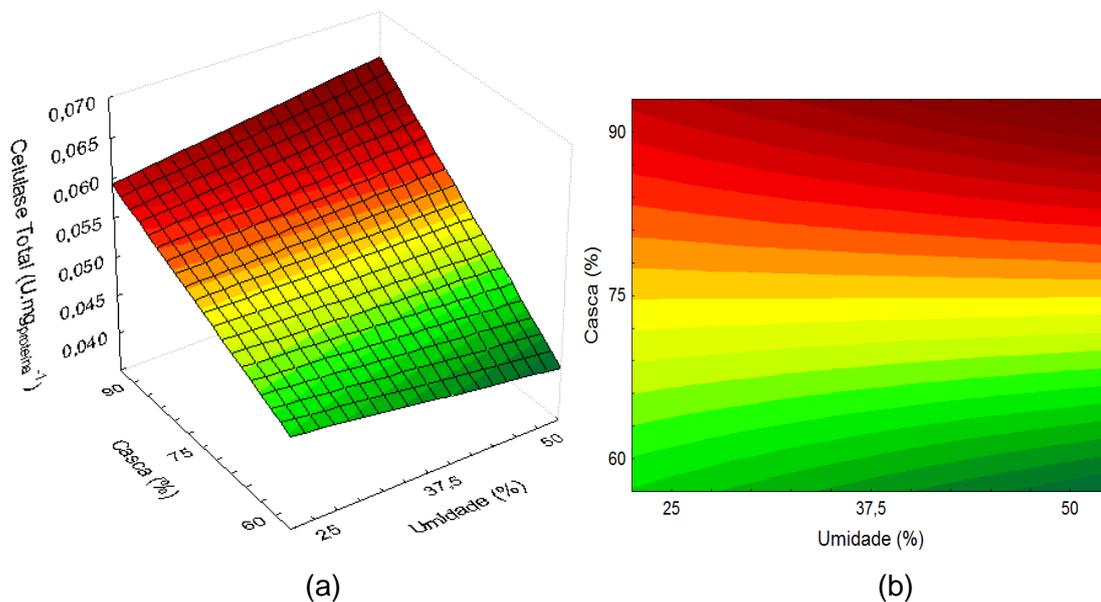


Figura 9- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) no segundo DCC de *T. reesei*.

Nas Figura 8 e 9, pode-se observar maior atividade de endoglicanase em concentrações mais elevadas de casca e teor de umidade. Portanto, as superfícies indicaram a necessidade de um aumento nos teores de umidade e casca de arroz para uma maior atividade enzimática.

A partir desse resultado foi realizado o DCCR. Na Tabela 28 estão apresentados os valores reais, codificados e as respostas para a atividade específica da endoglicanase e celulase total.

Tabela 28- Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> para processo fermentativo com *T. reesei*.

Ensaio	Umidade (X <sub>1</sub> ) (%)	Casca (X <sub>2</sub> ) (%)	Endoglicanase (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )	Celulase Total (U.mg <sub>proteína</sub> <sup>-1</sup> )
1	-1 (35)	-1 (87,2)	0,086	0,046
2	1 (65)	-1(87,2)	0,021	0,018
3	-1 (35)	1 (97,8)	0,059	0,044
4	1 (65)	1 (97,8)	0,054	0,051
5	0 (50)	- α (85)	0,063	0,036
6	0 (50)	α (100)	0,108	0,054
7	- α (29)	0 (92,5)	0,064	0,043
8	α (71)	0 (92,5)	0,039	0,029
9	0 (50)	0 (92,5)	0,073	0,040
10	0 (50)	0 (92,5)	0,070	0,040
11	0 (50)	0 (92,5)	0,068	0,040

α=1,414.

Os resultados para atividade específica de endoglicanase variaram de 0,021-0,108 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> e de celulase total entre 0,018-0,054 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>. A condição que apresentou melhor atividade para ambas as enzimas estudadas correspondeu ao ensaio 6, com um teor de umidade inicial de 50% e a utilização somente de casca como substrato (100%).

O efeito estimado do teor de umidade (X<sub>1</sub>) e casca (X<sub>2</sub>) para os parâmetros lineares (L) e quadrático (Q) indicou a influência de cada variável na atividade específica das enzimas celulolíticas. Os valores em destaque representam os coeficientes de regressão das variáveis e suas interações com o nível de significância (p) inferior a 5% para atividade enzimática (Tabela 29).

Tabela 29- Efeitos sobre a atividade específica ( $U \cdot mg_{proteína}^{-1}$ ) para o DCCR 2<sup>2</sup> de *T. reesei*

	Fatores	CR	EE	EP	t(2)	p
Endoglicanase	<b>Média</b>	<b>0,068</b>	<b>0,068</b>	<b>0,0028</b>	<b>23,58</b>	<b>0,0018</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(L)</b>	<b>-0,013</b>	<b>-0,026</b>	<b>0,0035</b>	<b>-7,44</b>	<b>0,0176</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(Q)</b>	<b>-0,012</b>	<b>-0,023</b>	<b>0,0042</b>	<b>-5,50</b>	<b>0,0315</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(L)</b>	<b>0,009</b>	<b>0,018</b>	<b>0,0035</b>	<b>4,99</b>	<b>0,0378</b>
	Casca (X <sub>2</sub> )(Q)	0,006	0,011	0,0042	2,64	0,1185
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>0,015</b>	<b>0,030</b>	<b>0,0050</b>	<b>6,07</b>	<b>0,0261</b>
Celulase Total	<b>Média</b>	<b>0,040</b>	<b>0,040</b>	<b>0,00002</b>	<b>2137,83</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(L)</b>	<b>-0,005</b>	<b>-0,010</b>	<b>0,00002</b>	<b>-428,53</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Umidade (X<sub>1</sub>)(Q)</b>	<b>-0,002</b>	<b>-0,005</b>	<b>0,00003</b>	<b>-169,44</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(L)</b>	<b>0,007</b>	<b>0,014</b>	<b>0,00002</b>	<b>606,13</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>Casca (X<sub>2</sub>)(Q)</b>	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>	<b>0,00003</b>	<b>171,41</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub></b>	<b>0,009</b>	<b>0,017</b>	<b>0,00003</b>	<b>529,08</b>	<b>&lt;0,0001</b>

CR- coeficiente de regressão, EE- efeito estimado, EP- erro puro, t-coeficiente, p- nível de significância, L-linear, Q-quadrático.

Para endoglicanase, somente a variável quadrática do teor de casca não foi significativa, enquanto que para celulase total todas apresentaram significância ( $p < 0,05$ ). As variáveis, linear e quadrática da umidade apresentaram um efeito negativo nas atividades de endoglicanase e celulase total, enquanto que a variável teor de casca e a interação apresentaram efeito positivo.

Para a verificação do modelo matemático que descreve o comportamento das atividades enzimáticas durante o processo fermentativo foi realizado uma análise de variância, apresentada na Tabela 30, considerando apenas os efeitos significativos das variáveis estudadas

Tabela 30- ANOVA para a resposta atividade específica ( $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ ) para o DCCR 2<sup>2</sup> de *T. reesei*

Enzima	Fonte	GL	SQ	MQ	F <sub>calculado</sub>
Endoglicanase	Regressão	4	0,004003	0,00100	5,08
	Resíduo	6	0,001182	0,00020	
	Falta de ajuste	4	0,001132		
	Erro puro	2	0,000050		
	Total	10	0,005185		
	R <sup>2</sup>	0,772		F <sub>tabelado (4;6;0,05)</sub> -4,53	
Celulase Total	Regressão	5	0,000973	0,000195	195
	Resíduo	5	0,000007	0,000001	
	Falta de ajuste	3	0,000007		
	Erro puro	2	0,000000		
	Total	10	0,000980		
	R <sup>2</sup>	0,993		F <sub>tabelado (5;5;0,05)</sub> - 5,05	

GL- graus de liberdade, SQ- soma dos quadrados, MQ- média dos quadrados.

O modelo para celulase total apresentou significância estatística, pois o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (195) foi 38 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (5,05), então, pode-se afirmar que o modelo é confiável para prever a atividade enzimática. O coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) mostrou que 99% da variação na resposta foram explicadas pela função estimada. Com os valores de coeficientes de regressão obtidos pela análise, o modelo apresentou a seguinte equação:

$$\text{Celulase Total}(\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}): 0,040 - 0,005X_1 - 0,002X_1^2 + 0,007X_2 + 0,002X_2^2 + 0,0090X_1X_2$$

(Eq.18)

A endoglicanase apresentou um  $F_{\text{calculado}}$  superior ao tabelado e um coeficiente de determinação relativamente baixo (77%), no entanto, de acordo com Dedavid e Silva et al (2009), um valor de  $R^2$  superior a 75% indica a adaptação do modelo. Sendo assim, o modelo foi considerado significativo, uma vez que os resultados foram avaliados com um nível de confiança de 95%, apresentando a seguinte equação:

$$\text{Endoglucanase}(\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}): 0,068 - 0,013X_1 - 0,012X_1^2 + 0,009X_2 + 0,006X_1X_2 \text{ (Eq.19)}$$

Com os modelos descritos foram construídas as superfícies de resposta e as respectivas curvas de contorno para endoglucanase (Figura 10) e celulase total (Figura 11).

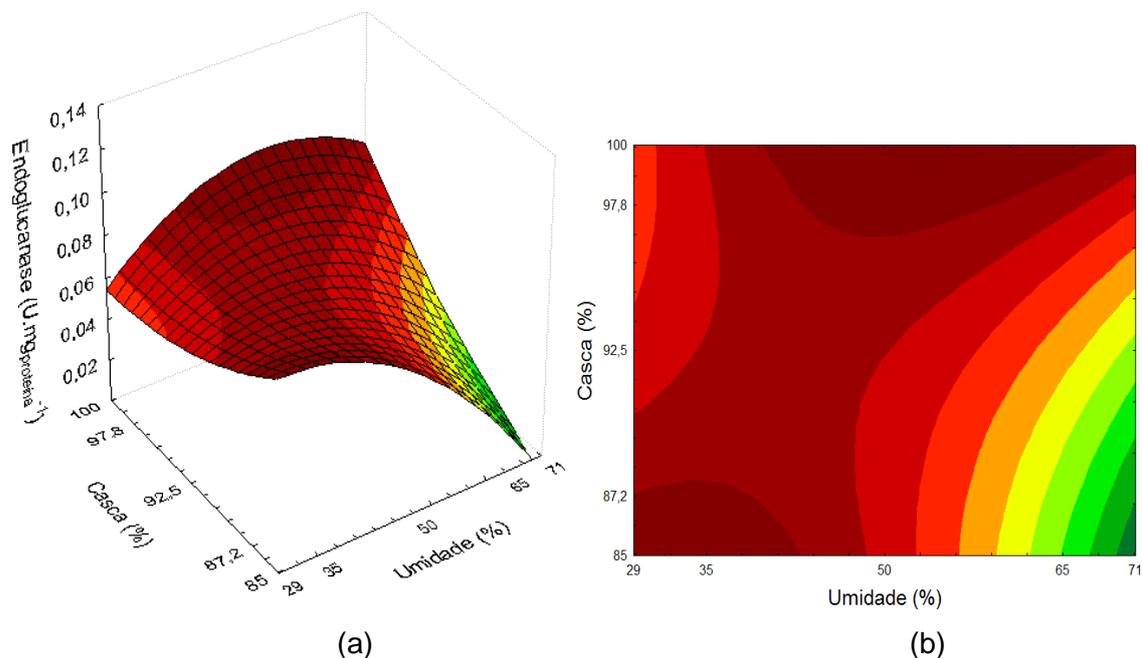


Figura 10- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de endoglucanase em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) do DCCR de *T. reesei*.

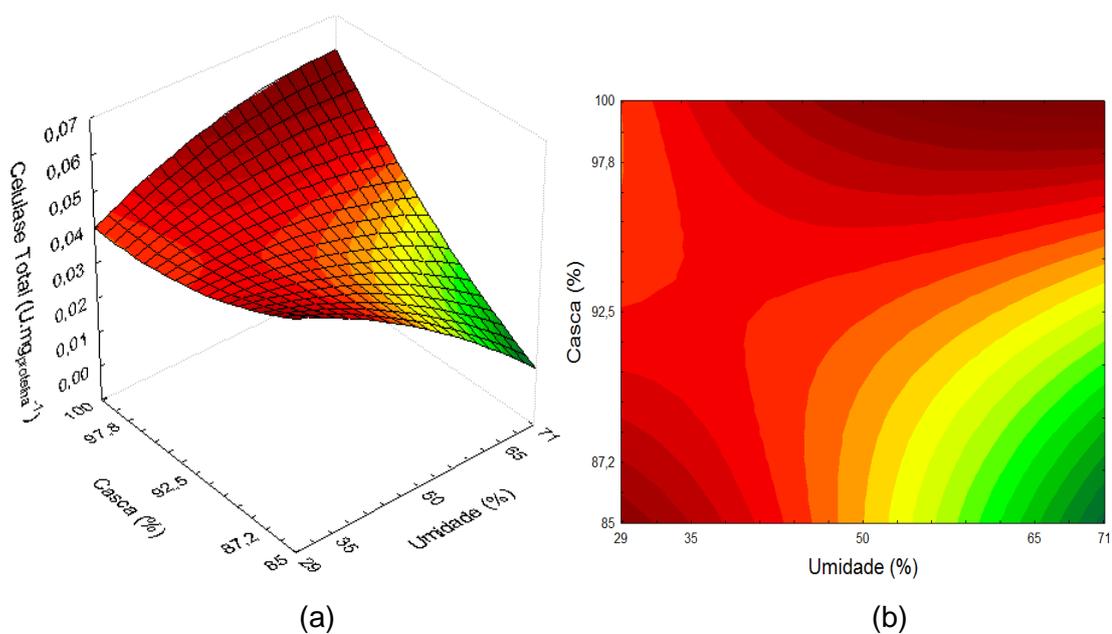


Figura 11- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade específica de celulase total em função: do teor de casca (%) e umidade inicial (%) do DCCR de *T. reesei*.

Pode-se observar que ao contrário do obtido por *R. oryzae* não há apenas uma região de otimização para as enzimas produzidas por *T. reesei* (em vermelho escuro), mostrada nas Figuras 10 e 11. Sendo assim, para a determinação da melhor condição de cultivo, foi realizada a determinação dos valores preditivos das atividades, substituindo-se as variáveis nos modelos obtidos nas Equações 18 e 19, obtendo-se como melhor condição 100% de casca e 50% de umidade, apresentando um aumento de 6 e 3,6 vezes na atividade de endoglicanase e celulase total, respectivamente. Portanto, essa condição encontrada será utilizada para o estudo da cinética de produção enzimática de *T. reesei*.

Mekala et al. (2008) avaliaram através de um delineamento experimental do tipo Box-Behnken a influência das variáveis concentração de indutor (celulose), temperatura e o tempo de fermentação na atividade de celulases totais. O micro-organismo utilizado foi *Trichoderma reesei* RUT C30 tendo como substrato bagaço de cana e os resultados demonstraram que uma maior produção enzimática correspondia a utilização da maior concentração de indutor (0,331 mL/g<sub>substrato</sub>) a uma temperatura de 33°C durante 65h.

Dedavid et al. (2009) avaliaram através da metodologia de superfícies de resposta a influência da concentração de substrato (casca e semente de uva) e de peptona na atividade de celulase total e endoglicanase durante fermentação submersa com *Aspergillus phoenicis*. Os resultados obtidos indicaram que os parâmetros lineares das variáveis utilizadas apresentaram efeito positivo e significativo tanto para endoglicanase quanto para celulase total.

Esta metodologia também foi utilizada por Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010) no estudo das condições de cultivo (tamanho de partícula, aeração e tempo) para a produção de enzimas celulolíticas durante FES de farelo de arroz com *Trichoderma reesei* QM 9414. Para celulase total, os parâmetros tamanho de partícula e aeração foram significativos, apresentando uma diminuição da atividade com o aumento dos níveis destas variáveis (efeito negativo). O tempo de fermentação e o tamanho de partícula foram significativos para a atividade de endoglicanase, apresentando um efeito negativo.

Jabasingh e Vallinachiyar (2011) otimizaram o meio de cultivo para a produção de endoglicanases durante fermentação submersa com *Aspergillus nidulans* um delineamento composto central. As variáveis utilizadas foram determinadas através de resultados preliminares da avaliação de cada fator separadamente e de planejamento do tipo Plackett Burman, sendo estas: concentração da fonte de carbono

(carboximetilcelulose), nitrogênio (nitrato de amônio), sais minerais (fosfato de potássio) e tiamina. Os resultados das superfícies de resposta indicaram que seria necessário um aumento na fonte de carbono e diminuição da fonte de nitrogênio para obtenção da maior atividade enzimática.

Santos et al. (2011) avaliaram o efeito do conteúdo de água, temperatura e tempo de fermentação na atividade de endoglicanase e celulase total durante FES com *Aspergillus niger*, empregando casca de batata como substrato. Para endoglicanase todas as variáveis apresentaram um efeito significativo, enquanto que para celulase total somente o conteúdo de água não foi significativo. As condições ótimas para a produção de ambas as enzimas foram semelhantes, em torno de 30°C, 50% de umidade durante 80 h.

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para a otimização de produção enzimática, salientando-se a importância da utilização de diferentes coprodutos agroindustriais para este fim. Além disso, de acordo com Mahanta, Gupta e Khare (2008), o teor de água é um fator significativo no processo de fermentação. Alta atividade de água provoca a diminuição da porosidade do substrato, reduzindo assim a troca de gases. Por outro lado, baixa atividade de água pode resultar na redução do crescimento microbiano e conseqüente menor produção da enzima, justificando assim o estudo realizado neste trabalho.

#### **5.4.1 Avaliação da influência de solução nutriente e tipo de biorreator**

Com o intuito de verificar se a atividade enzimática ainda poderia sofrer um incremento, antes da avaliação da cinética de produção enzimática, foram realizados testes quanto ao tipo de biorreator utilizado (bandeja e erlenmeyer) e a solução nutriente (ausência, solução A (com uréia) e solução B (sem uréia), sendo os resultados apresentados na Figura 12, expressos como atividade relativa que relaciona a atividade em cada condição com a atividade máxima encontrada.

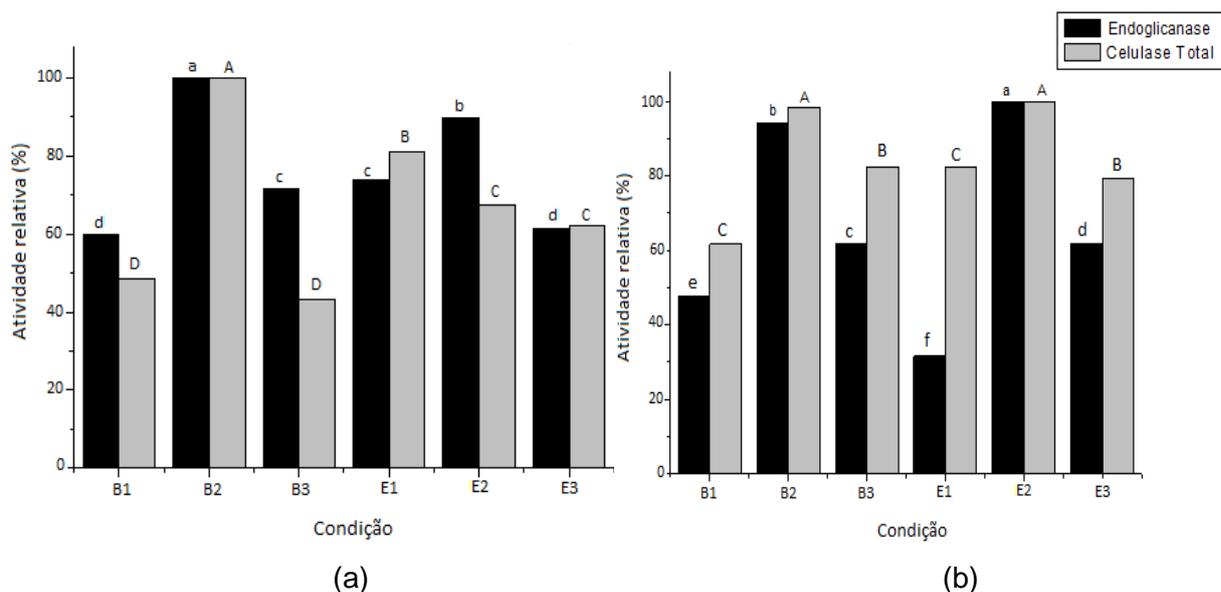


Figura 12– Influência de biorreatores e solução nutricional nas atividades específicas para *R. oryzae* (a) e *T. reesei* (b). B- biorreator de bandeja; E-erlenmeyer; 1-ausência, 2- solução A, 3-solução B.

Pode-se observar que com relação ao biorreator utilizado, *R. oryzae* apresentou maior atividade para ambas as enzimas utilizando bandejas, enquanto que para *T. reesei*, os melhores resultados foram obtidos em erlenmeyers com agitação a 150 rpm. Esse comportamento pode ser justificado pelo ciclo biológico característico de cada espécie de fungo estudado. O *R. oryzae*, zigomiceto, forma esporângios que quando amadurecem liberam esporos para o ar, sendo mais susceptível à agitação que *T. reesei*, do tipo ascomiceto cujos esporos sexuais ficam armazenados em células na forma de ascos, que conferem maior resistência a ruptura por ação física como a agitação (PELCZAR et al., 2010).

Ahamed e Vermette (2010), durante estudo da influência da agitação na produção de celulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 verificam uma maior produtividade no sistema com agitação, corroborando para o encontrado neste trabalho.

O comportamento da produção enzimática foi similar para os dois micro-organismos utilizados durante a avaliação da composição da solução nutricional, apresentando maiores atividades quando utilizada a solução A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sendo esta amplamente estudada na produção de enzimas celulolíticas (MARTINS et al., 2008; SUN, CHENG e LEE, 2008; CAMASSOLA e DILLON, 2010). Esses

resultados corroboram com a conveniência de usar conjuntamente as duas fontes de nitrogênio no meio, como proposto para a secreção de celulases para *T. reesei*. Uma explicação para esta interação positiva pode estar relacionada ao pH do meio, uma vez que, quando sais de amônio estão presentes, o pH do meio torna-se ácido pela absorção de  $\text{NH}_3$  na célula. A uréia, pelo fato de liberar amônia, poderia atuar como um fator tamponante (SAID e PIETRO, 2004).

### 5.5 Cinética de produção enzimática

As condições utilizadas para este estudo foram determinadas mediante os resultados do efeito indutor, otimização de produção, efeito de biorreatores e solução nutriente.

Para *R. oryzae* utilizou-se um período de 45h, pois o pico de produção foi em 24h no estudo preliminar (efeito indutor), enquanto pra *T. reesei* este tempo foi superior, avaliando-se até 75 h, pois a atividade máxima obtida ficava constante entre 24 e 72 h.

A partir dos resultados obtidos nos delineamentos compostos centrais rotacionais realizados, definiu-se para *R. oryzae* fermentação em biorreatores do tipo bandeja utilizando como substrato 82,5% de casca e 17,5% de farelo de arroz, com umidade inicial de 30%, enquanto que para *T. reesei* teve somente casca com substrato, um teor de umidade de 50% e foi conduzida em erlenmeyers.

O comportamento apresentado para as enzimas celulolíticas na cinética de produção para *R. oryzae* e *T. reesei* está descrito nas Figuras 13 e 14.

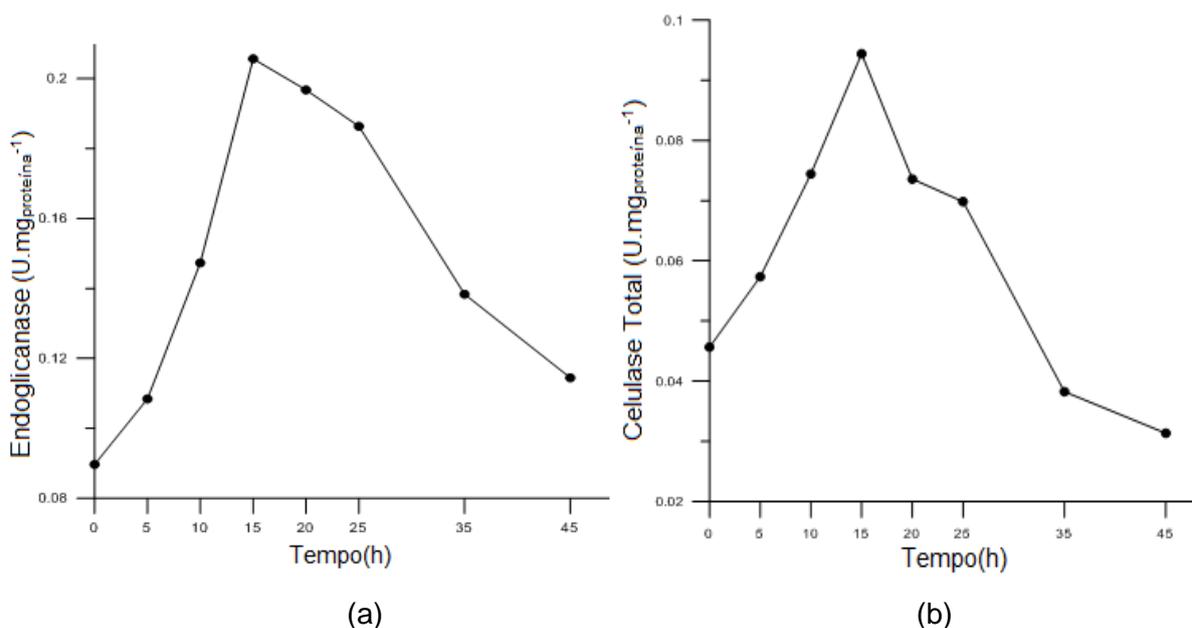


Figura 13- Cinética de produção das enzimas endoglicanase (a) e celulase total (b) na condição otimizada de fermentação com *R. oryzae*

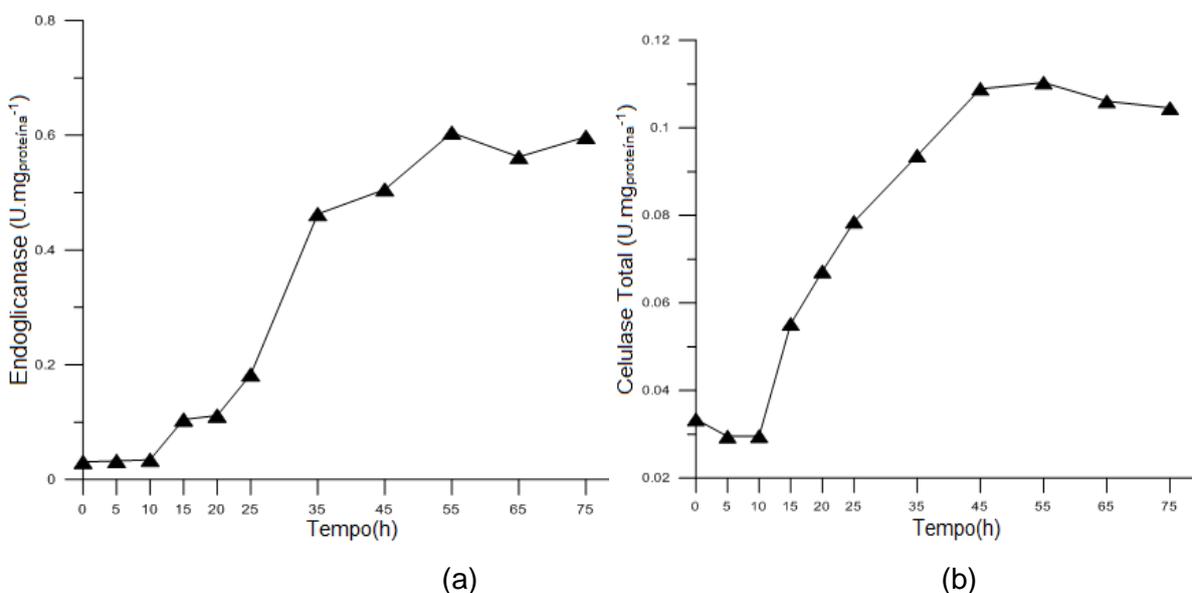


Figura 14- Cinética de produção das enzimas endoglicanase (a) e celulase total (b) na condição otimizada de fermentação com *T. reesei*

Durante o cultivo ocorreu um aumento da atividade celulolítica para ambos os micro-organismos estudados, sendo este de 2,3 e 2,0 vezes para endoglucanase e celulase total de *R. oryzae*; 20,0 e 3,0 vezes para endoglucanase e celulase total de *T. reesei*, respectivamente. Conforme observado nas Figuras acima, o comportamento durante a produção enzimática diferiu entre os micro-organismos estudados, apresentando picos de produção enzimática em 15 h para *R. oryzae* e 55 h para

*T. reesei*. O decréscimo de atividade observado durante fermentação com *R. oryzae* pode ser atribuído a produção de protease, sendo esta já relatada por Oliveira (2009) durante processo fermentativo em farelo de arroz com este micro-organismo.

Os resultados encontrados foram esperados, pois o gênero *Trichoderma* é reconhecido por secretar enzimas do complexo celulolítico, no entanto cabe ressaltar que o pico de produção enzimática de *R. oryzae* ocorreu durante 15 h de fermentação, portanto para melhor comparação da produção foi realizado o cálculo de produtividade no tempo ótimo para ambos os micro-organismos (Tabela 31).

Tabela 31- Produtividade e produtividade específica das enzimas celulolítica produzidas durante fermentação.

Micro-organismo	Produtividade (U.g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		Produtividade específica (U.mg <sub>glicosamina</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	
	Endoglicanase	Celulase total	Endoglicanase	Celulase total
<i>R. oryzae</i>	0,22	0,09	2,09	0,85
<i>T. reesei</i>	0,27	0,05	0,23	0,04

Apesar da atividade encontrada para as enzimas de *T. reesei* ser superior em termos de produtividade, quando determinado a produtividade específica, que correlaciona a produção com o crescimento do micro-organismo, os valores para *R. oryzae* foram superiores. Esse comportamento pode ser explicado devido ao tempo inferior necessário para a produção enzimática por *R. oryzae*, demonstrado pela baixa produção de glicosamina tornando esse micro-organismo uma fonte promissora dessas enzimas celulolíticas.

A atividade específica da enzima comercial Celluclast® foi determinada, obtendo valor de 0,263 e 1,285 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, para celulase total e endoglicanase, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, pois apresentam atividades máximas para celulase total e endoglicanase de *R. oryzae* 0,094 e 0,206 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, correspondente a 0,43 e 0,92 U.mL<sup>-1</sup> e 2,33 e 5,08 U.g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>; para *T. reesei* 0,110 e 0,605 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup>, correspondente a 0,32 e 0,97 U.mL<sup>-1</sup> e 2,78 e 15,26 U.g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. Cabe ressaltar que essas correspondiam a extratos brutos, enquanto que a enzima comercial passou por diferentes processos de purificação. Além disso, neste trabalho, a indução da enzima foi realizada com o emprego da casca e não foi realizada a adição de nenhum outro

componente como CMC (carboximetilcelulose) no meio fermentativo como acontece em outros trabalhos (EKPERIGIN, 2007; GRIGOREVSKI DE LIMA et al., 2005; NIRANJANE, MADHOU e STEVENSON, 2007). Essa atividade pode ser aumentada com o emprego dessa técnica, bem como através de purificação que visam eliminar proteínas que não apresentam a ação catalítica desejada.

Sun, Cheng e Lee (2008) avaliaram a produção de *T. reesei* RUT C-30 em palha de arroz com diferentes tratamentos. A maior produção de celulases totais foi obtida após 12 dias de fermentação, apresentando valores para a palha tratada em meio alcalino 0,16 U/mL e para a palha de arroz em pó de 0,12 U/mL. Os resultados obtidos foram aproximadamente 56,3% e 67,5% inferiores ao encontrado no presente trabalho (sem tratamento químico de substrato) para *T. reesei* e *R. oryzae*, respectivamente.

Menezes, Silva e Durrant (2009) estudaram a fermentação submersa (FS) com diferentes linhagens de *Pleurotus* em bagaço de cana verificaram uma produção máxima de endoglicanase de 0,06 U/mL no 10º dia de incubação utilizando *Pleurotus tailândia*, sendo o valor observado para *R. oryzae* e *T. reesei* 15 e 16 vezes superior, respectivamente.

Yang, Sheih e Fang (2011) utilizaram casca de arroz pré-tratada com irradiação ultrassônica para fermentação em estado sólido (FES) com *Aspergillus japonicus* e obtiveram um aumento significativo da atividade de endoglicanase em 7 dias de fermentação. O valor encontrado (1 U/mL) foi semelhante ao encontrado no presente estudo em 15 e 55 h de fermentação para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente, sem tratamento prévio do substrato.

Zhao et al. (2010) avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino e com micro-ondas nos substratos utilizados (farelo de trigo e casca de arroz) na FES com *Trichoderma sp.* O pré-tratamento proporcionou um aumento de 35 e 21% na atividade de celulase total e endoglicanases, respectivamente. A maior atividade foi reportada entre 48-60 h de fermentação para celulase total ( $6 \text{ U.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ) e entre 36-48 h para endoglicanase ( $6 \text{ U.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ ). O resultado para celulase total é superior ao encontrado no presente trabalho, no entanto para endoglicanase este foi 2,5 vezes inferior ao encontrado para *T. reesei*.

Como os substratos utilizados apresentaram outros carboidratos na sua composição, também foram determinadas as atividades de amilase e pectinase para os extratos enzimáticos obtidos após a otimização das condições de produção do complexo celulolítico (Figuras 15 e 16).

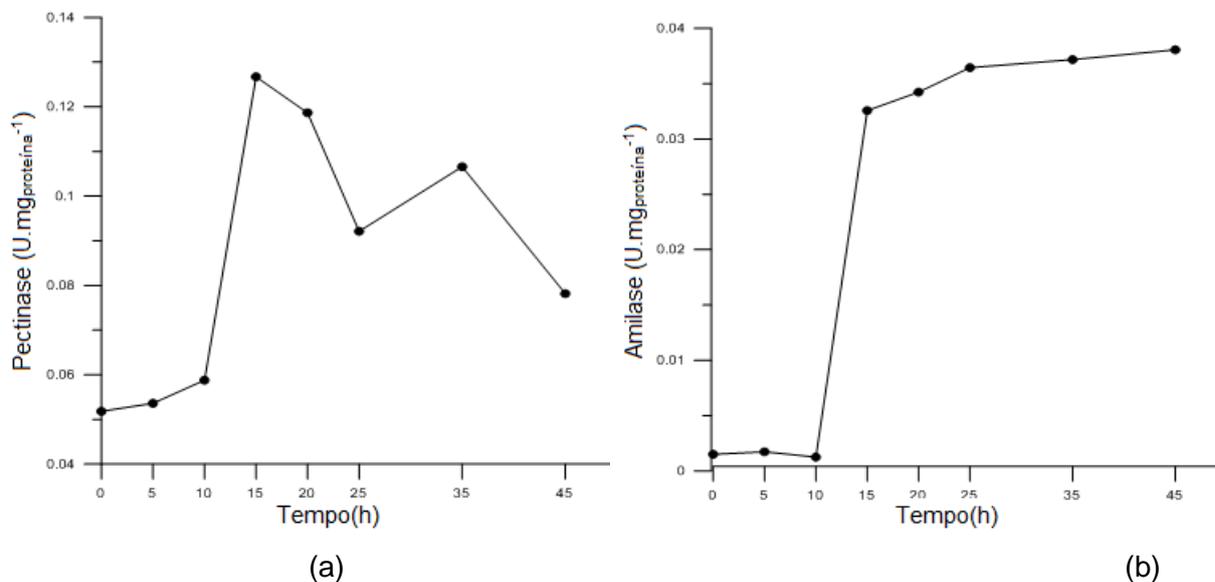


Figura 15- Cinética de produção das enzimas pectinase (a) e amilase (b) na condição otimizada de fermentação com *R. oryzae*.

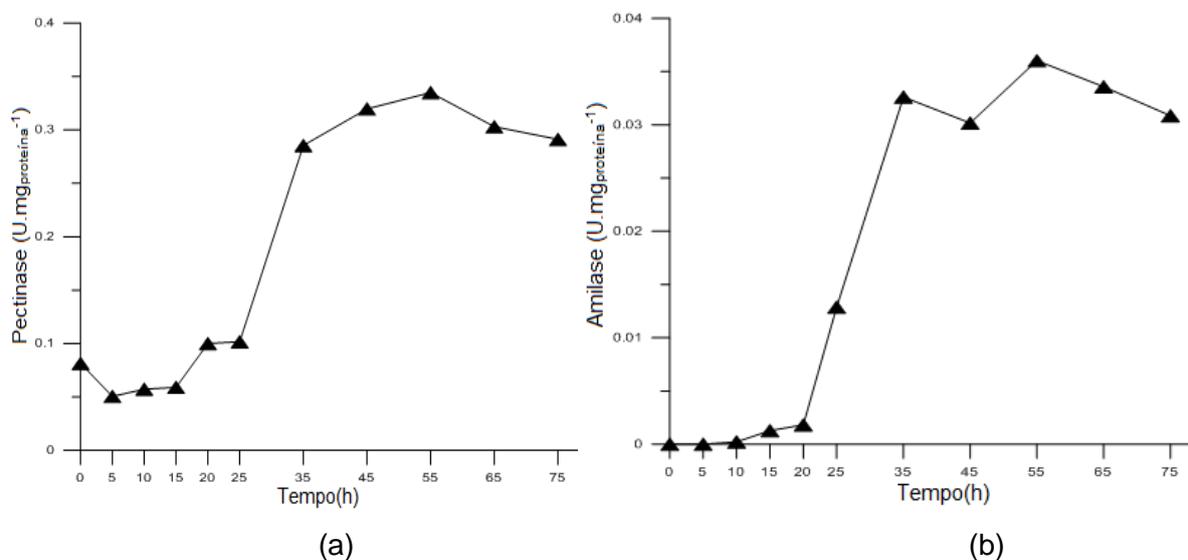


Figura 16- Cinética de produção das enzimas pectinase (a) e amilase (b) na condição otimizada de fermentação com *T. reesei*.

A produção das enzimas amilolíticas seguiu mesmo comportamento para as duas fermentações, apresentando um aumento de atividade após 15 e 35 h ao utilizar-se *R. oryzae* e *T. reesei*. Após esse intervalo de tempo, a atividade enzimática manteve-se praticamente constante, com valor médio de 0,035 U.mg<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> nas duas condições estudadas, com a máxima em 45 e 55 h para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente.

A atividade de pectinase durante fermentação de *T. reesei* apresentou uma tendência semelhante ao ocorrido para amilase, mantendo-se praticamente constante após 35 h de fermentação. O comportamento obtido durante processo fermentativo com *R. oryzae* apresentou semelhança com a produção de enzimas do complexo celulolítico, pois após a obtenção da atividade máxima ocorreu um decréscimo da mesma.

De acordo com Santos et al. (2008) os fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* são geralmente utilizados como fonte de pectinase. No entanto, neste experimento destacou-se a atividade encontrada para *T. reesei* que foi 3 vezes superior a encontrada para *R. oryzae*. Complexos enzimáticos contendo atividade de pectinase podem apresentar um papel importante na hidrólise de polissacarídeos, permitindo um maior acesso de celulases para celulose (HALTMEIER et al., 1983). Tal fato pode justificar a maior atividade celulolítica encontrada, tornando interessante o resultado obtido nesse trabalho.

As enzimas carboidrolíticas estudadas apresentaram uma atividade máxima no mesmo período de fermentação com *R. oryzae* e *T. reesei*, 15 e 55 h, respectivamente.

Para confirmar a liberação de açúcares decorrente da ação de enzimas carboidrolíticas de origem fúngica, esses foram determinados no meio durante os períodos avaliados (Figura 17).

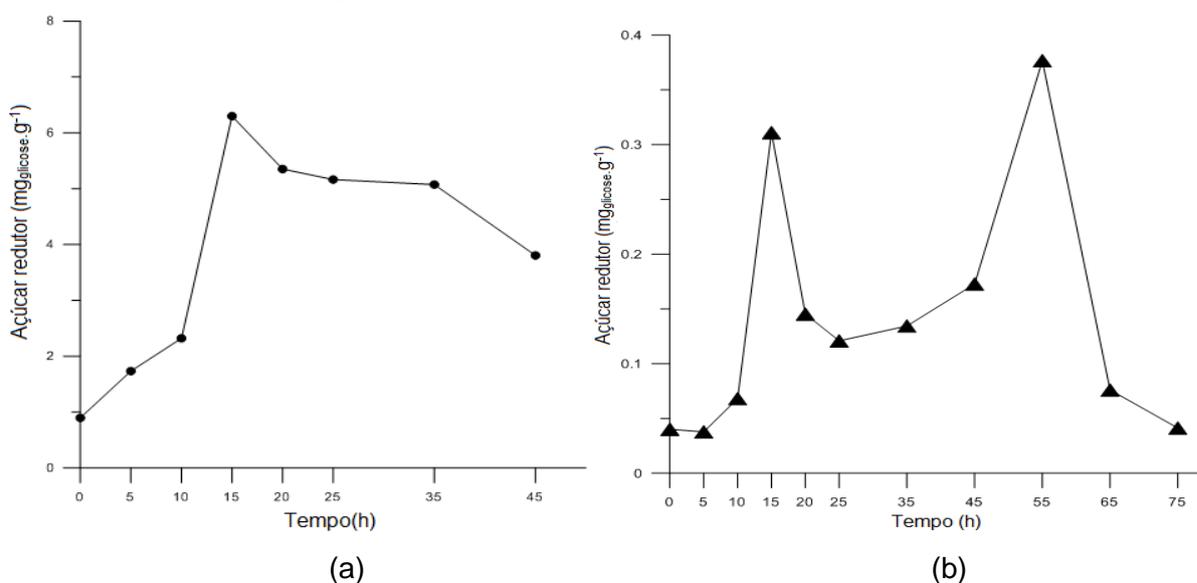


Figura 17- Acompanhamento da produção de açúcares redutores durante fermentação com *R. oryzae* (a) e *T. reesei* (b).

Pode-se observar que para ambas as fermentações, a maior liberação de açúcares redutores no meio coincidiu com o pico da atividade enzimática das enzimas celulolíticas, amilolíticas e pectinolíticas. A partir das curvas apresentadas na Figura 15 pode-se assumir que as enzimas do complexo celulítico apresentaram maior influência nessa liberação, pois após 15 e 55 h ao utilizar *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente, ocorreu diminuição nos teores de açúcares do meio, coincidindo com a diminuição da atividade das enzimas do complexo. Comportamento semelhante foi relatado por Botelha et al. (2005), ao estudar a fermentação em estado sólido de bagaço de uva. Durante este processo fermentativo ocorreu um pico do teor de açúcares redutores, correspondente a máxima atividade encontrada para endoglicanase e exo-poligalacturonase; o decréscimo coincidiu com a diminuição da atividade enzimática.

A multiplicação fúngica neste caso foi determinada através da estimativa do teor de glicosamina presente nos diferentes tempos de fermentação, conforme a Figura 18.

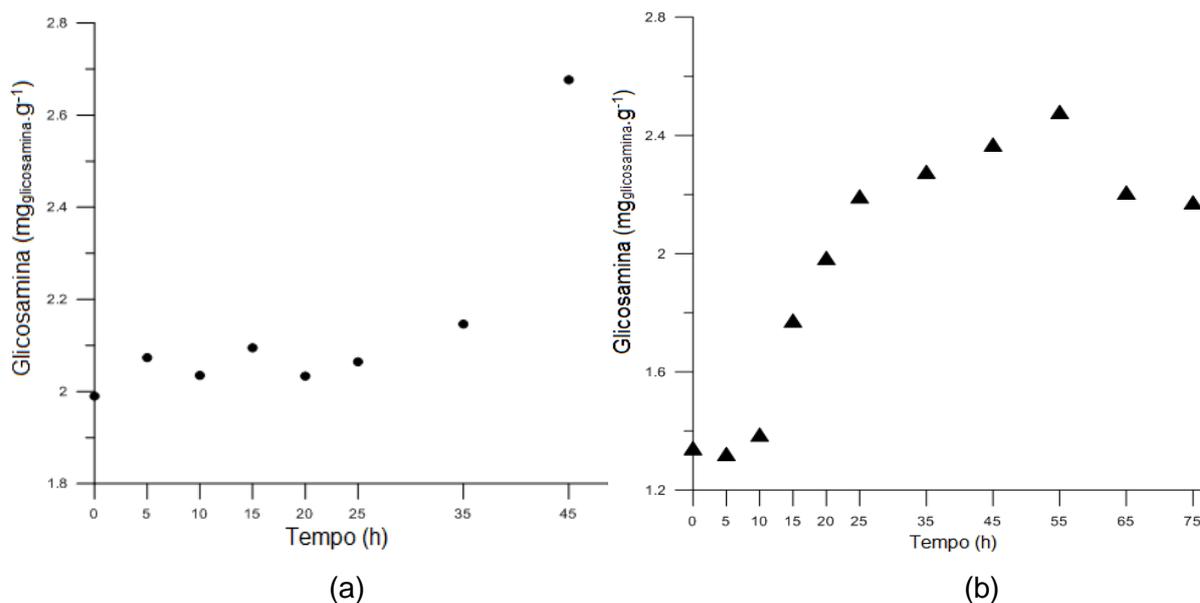


Figura 18- Acompanhamento do crescimento fúngico durante fermentação com *R. oryzae* (a) e *T. reesei* (b).

As curvas de multiplicação fúngica indicadas pela produção de glicosamina durante os cultivos foram diferentes, pois o tempo necessário para *T. reesei* foi superior, para que ocorressem todas as fases do crescimento até o decréscimo, enquanto que o cultivo de *R. oryzae* o aumento de glicosamina não permitiu identificar

o final da fase exponencial; não possibilitando a determinação da velocidade máxima de multiplicação.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o tempo ideal de fermentação para obtenção de enzimas celulolíticas é de 15 h para *R. oryzae* e 55 h para *T. reesei*. A partir dessas condições foram determinadas as características bioquímicas e os parâmetros cinéticos das enzimas obtidas nessas condições.

## 5.6 Caracterização bioquímica das atividades celulolíticas

As enzimas, em função de sua natureza protéica, são altamente sensíveis a variações de pH, temperatura e concentração da própria enzima, entre outros fatores. Portanto, o conhecimento desses parâmetros sobre a reação enzimática permite explorar melhor as suas propriedades catalíticas (GOMES et al., 2006).

### 5.6.1 Determinação da temperatura ótima

As reações enzimáticas têm sua velocidade aumentada pelo acréscimo da temperatura dentro da faixa em que a enzima é estável e mantém sua atividade integral, enquanto que a temperatura ótima corresponde aquela na qual o efeito do aumento da temperatura na proporção de quebra do complexo ES é exatamente contrabalançado pela desnaturação da enzima (BADIALE-FURLONG, 2000). Neste trabalho esse efeito foi avaliado na faixa de 10 – 80 °C (Tabela 32) e estimado como atividade relativa.

Tabela 32- Influência da temperatura na atividade de endoglicanase e celulase total

Temperatura (°C)	<i>R. oryzae</i>		<i>T. reesei</i>	
	Endoglicanase* (%)	Celulase Total*(%)	Endoglicanase* (%)	Celulase Total* (%)
10	65,8±0,1 <sup>d</sup>	92,3±0,1 <sup>A</sup>	4,2±0,2 <sup>e</sup>	57,1±0,3 <sup>C</sup>
20	69,1±0,7 <sup>d</sup>	92,3±0,4 <sup>A</sup>	12,8±1,0 <sup>d</sup>	70,7±0,2 <sup>BC</sup>
40	87,6±0,2 <sup>b</sup>	80,0±0,1 <sup>B</sup>	46,6±0,2 <sup>b</sup>	82,3±1,0 <sup>B</sup>
60	100,0±0,4 <sup>a</sup>	100,0±0,4 <sup>A</sup>	100,0±0,8 <sup>a</sup>	100,0±0,6 <sup>A</sup>
80	76,1±0,9 <sup>c</sup>	96,2±0,9 <sup>A</sup>	30,9±1,9 <sup>c</sup>	71,7±0,1 <sup>BC</sup>

\* Dados normalizados. Média±desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O aumento da temperatura proporcionou uma maior velocidade de reação em função do aumento da energia cinética das moléculas que compõem o sistema; porém em temperaturas elevadas pode ocorrer a desnaturação enzimática devido a alteração das ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). Esse comportamento foi observado em todas as enzimas estudadas, pois ocorreu aumento da atividade até a temperatura ótima de 60 °C e posterior decréscimo. Na temperatura de 80 °C as endoglicanases produzidas por *R. oryzae* e *T. reesei* apresentaram uma atividade relativa de 76 e 30%, enquanto que as celulasas apresentaram 96 e 72%, respectivamente.

Silva e Gouvea (2008) estudaram a produção de endoglicanases durante fermentação de bagaço de cana com *Streptomyces sp* e obtiveram uma temperatura ótima a 60 °C para atividade endogluconásica. Essa característica também foi obtida nas endoglicanases produzidas por *Bursaphelenchus xylophilus* (SHIBUYA e KIKUCHI, 2008) e *Fomitopsis pinicola* (YOON et al., 2008).

A temperatura ótima encontrada para as endoglicanases produzidas por *Bacillus* e *Geobacillus* foram a 70 e 75 °C, respectivamente (RASTOGI et al., 2010), enquanto que para *Aspergillus niger* foi a 45 °C (BEGUM e ABSAR, 2009). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho estão dentro da faixa encontrada na literatura, para indivíduos que podem ser considerados termo resistentes e as enzimas portanto, podem ser classificadas como termofílicas.

A energia de ativação da reação enzimática foi determinada a partir da linearização da equação de Arrhenius. Para as endoglicanases produzidas por *R. oryzae* e *T. reesei* obteve-se 6,95 e 48,90 KJ.mol<sup>-1</sup> e para celulase total 1,44 e 8,26 KJ.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em reações com alta energia de ativação, o acréscimo da temperatura aumenta a velocidade mais do que nas reações com baixa energia de ativação (SAID e PIETRO, 2004). Com base nisso, pode-se observar que a velocidade de reação das enzimas produzidas por *T. reesei* apresentou maior sensibilidade a temperatura, pois os maiores valores de energia de ativação são consistentes com os acréscimos ocasionados por 10 °C na temperatura na velocidade de reação (Tabela 32).

### 5.6.2 Determinação do pH ótimo

O pH influencia a atividade enzimática propiciando que os grupamentos do centro ativo fiquem na forma química adequada para reagirem com o substrato e na

estabilidade da conformação espacial da enzima (BADIALE-FURLONG, 2000). O efeito do pH na ionização do centro ativo foi avaliado variando o pH na faixa entre 3 e 8, na temperatura ótima de reação (60 °C), conforme a Tabela 33.

Tabela 33- Influência do pH na atividade de endoglicanase e celulase total

pH	<i>R. oryzae</i>		<i>T. reesei</i>	
	Endoglicanase* (%)	Celulase Total* (%)	Endoglicanase* (%)	Celulase Total* (%)
3	94,8±0,6 <sup>c</sup>	91,8±0,5 <sup>AB</sup>	99,1±1,0 <sup>a</sup>	21,8±0,1 <sup>D</sup>
4	97,6±0,1 <sup>abc</sup>	97,0±0,3 <sup>AB</sup>	95,6±1,2 <sup>ab</sup>	97,8±0,5 <sup>A</sup>
5	100,0±0,2 <sup>a</sup>	94,0±0,1 <sup>AB</sup>	96,5±1,9 <sup>a</sup>	100,0±0,4 <sup>A</sup>
6	99,1±0,4 <sup>ab</sup>	100,0±0,1 <sup>A</sup>	100,0±0,8 <sup>a</sup>	73,8±0,6 <sup>B</sup>
7	96,0±0,8 <sup>cd</sup>	89,6±0,9 <sup>B</sup>	91,3±0,1 <sup>b</sup>	46,2±0,1 <sup>C</sup>
8	98,2±0,3 <sup>abc</sup>	91,8±0,3 <sup>AB</sup>	98,4±0,1 <sup>a</sup>	41,8±0,2 <sup>C</sup>

\* Dados normatizados. Média±desvio padrão. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Ao contrário do ocorrido com a temperatura, não foi obtido um valor de pH característico para todas as enzimas, pois os resultados variaram conforme o micro-organismo estudado. Para as endoglicanases de *R. oryzae* e *T. reesei* os pHs ótimos foram de 5 e 6, e para celulase total de 6 e 5, respectivamente. Conforme observa-se na Tabela 33, as enzimas produzidas por *R. oryzae* e a endoglicanase produzida por *T. reesei*, apresentam alta atividade enzimática nos diferentes valores de pH avaliados, podendo ser empregue em diferentes setores e em diferentes condições.

Kaur et al. (2007), estudaram a produção de endoglicanases (EG) de um micro-organismo termofílico (*Melanocarpus* sp MTCC 3922) durante fermentação submersa obtiveram para EG I e EG II um valor de pH ótimo de 6 e 5, respectivamente. Celulases fúngicas com valores ótimos para pH 4,5 - 6,0 são comuns e tem sido obtidas para *Aspergillus oryzae* (BEGUM e ABSAR, 2009), *Chaetomium thermophilum* (LI et al., 2003), *Penicillium purpurogenum* (LEE et al., 2010), *Trichoderma reesei* (QIN et al., 2008).

Em geral, as endocelulases de fungos termofílicos são termoestáveis, com atividade ótima entre 55-80 °C e pH 4-6 (MAHESHWARI, BHARADWAJ e BHAT, 2000).

Comparando-se os ótimos obtidos para pH e temperatura de atuação das enzimas para os dois micro-organismos, pode-se observar que as enzimas obtidas de *T. reesei* foram mais sensíveis as mudanças de pH e temperatura.

As enzimas celulolíticas produzidas apresentam maior sensibilidade a temperatura do que ao pH. Portanto, foi realizada a determinação da sua estabilidade térmica nas temperaturas de 25, 60, 80 e 100 °C, durante 10 h.

### 5.6.3 Estabilidade térmica

A velocidade de desnaturação usualmente é considerada como sendo de primeira ordem em relação a concentração de enzima, conforme a lei de Arrhenius (SAID e PIETRO, 2004). A partir dessa hipótese, para cada temperatura avaliada foi construído o gráfico de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo, para obtenção do  $K_d$ , sendo estes demonstrados nas Figuras 19 a 26.

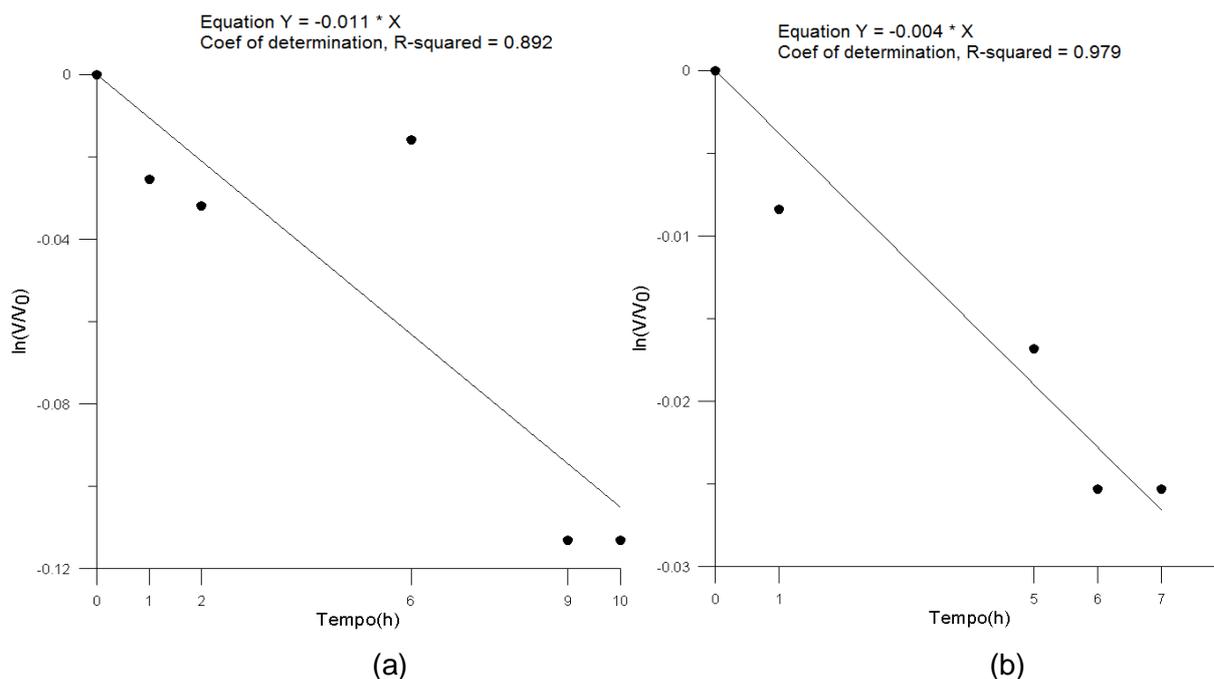


Figura 19- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 25°C de endoglucanase (a) e celulase total (b) produzidas por *R. oryzae*.

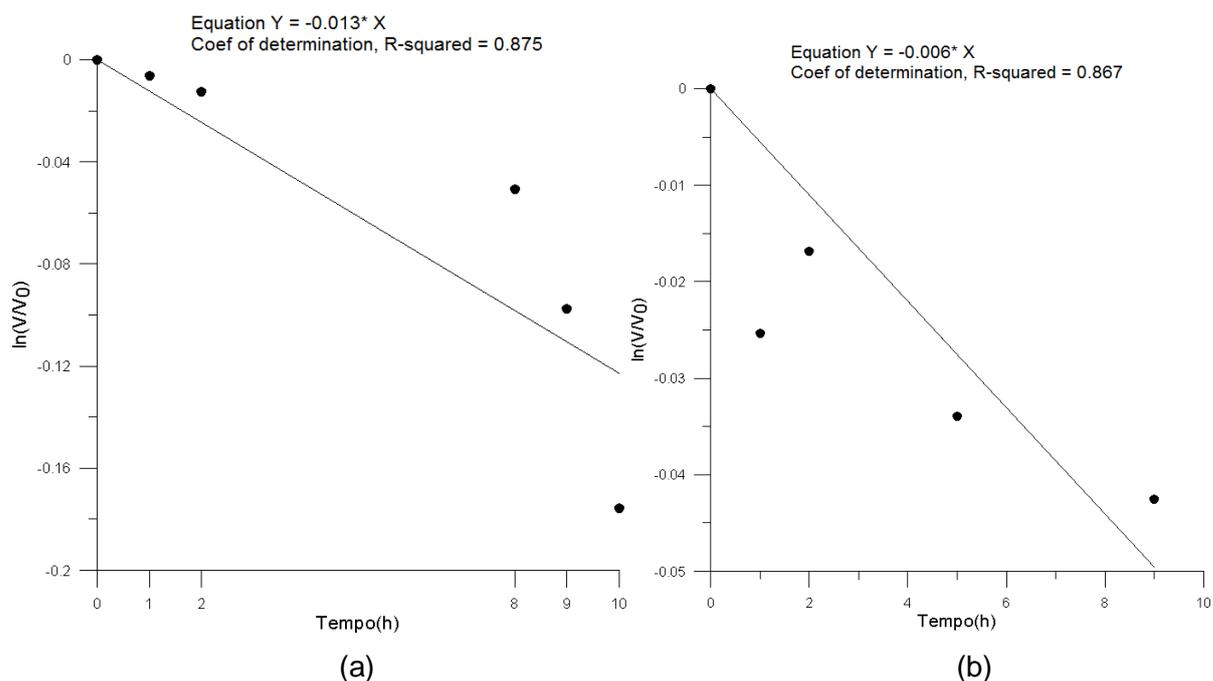


Figura 20- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 60°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por *R. oryzae*.

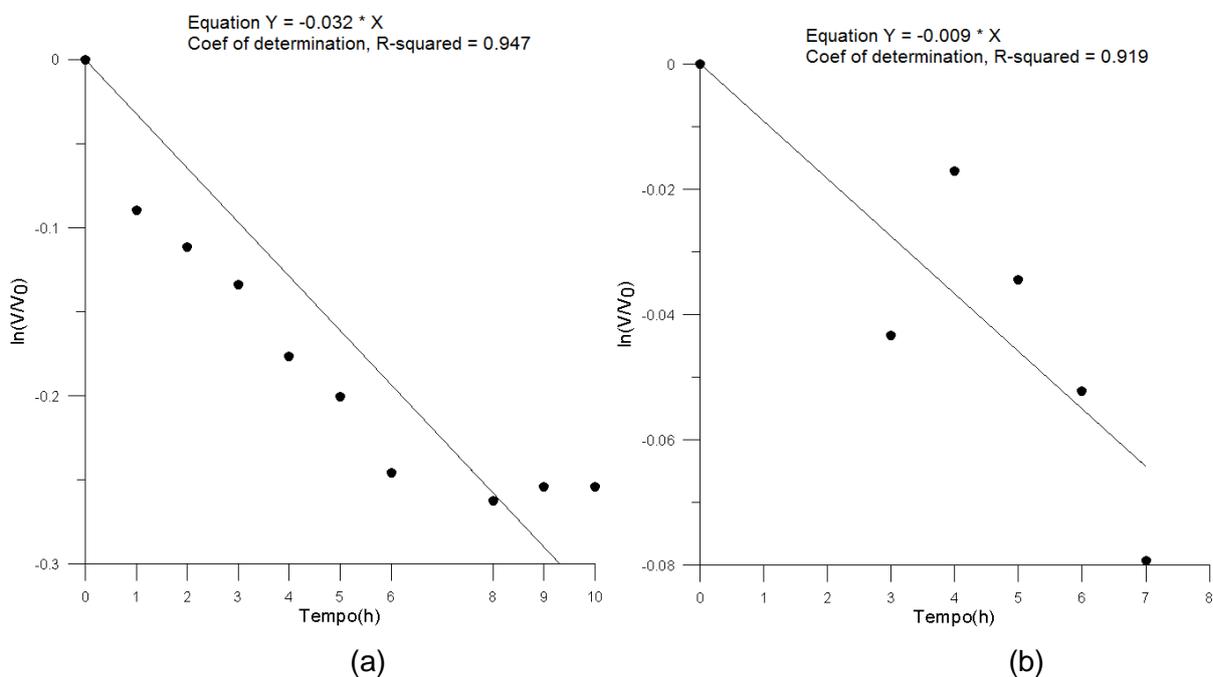


Figura 21- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 80°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por *R. oryzae*.

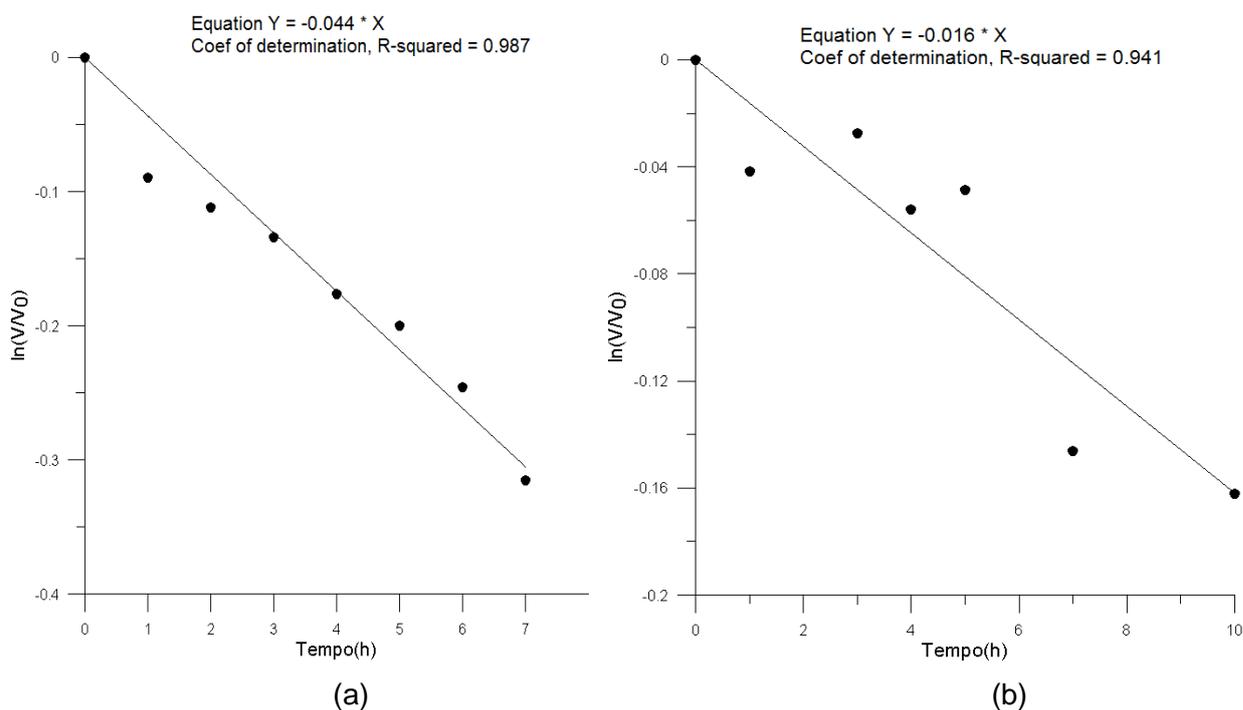


Figura 22- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 100°C de endoglucanase (a) e celulase total (b) produzidas por *R. oryzae*.

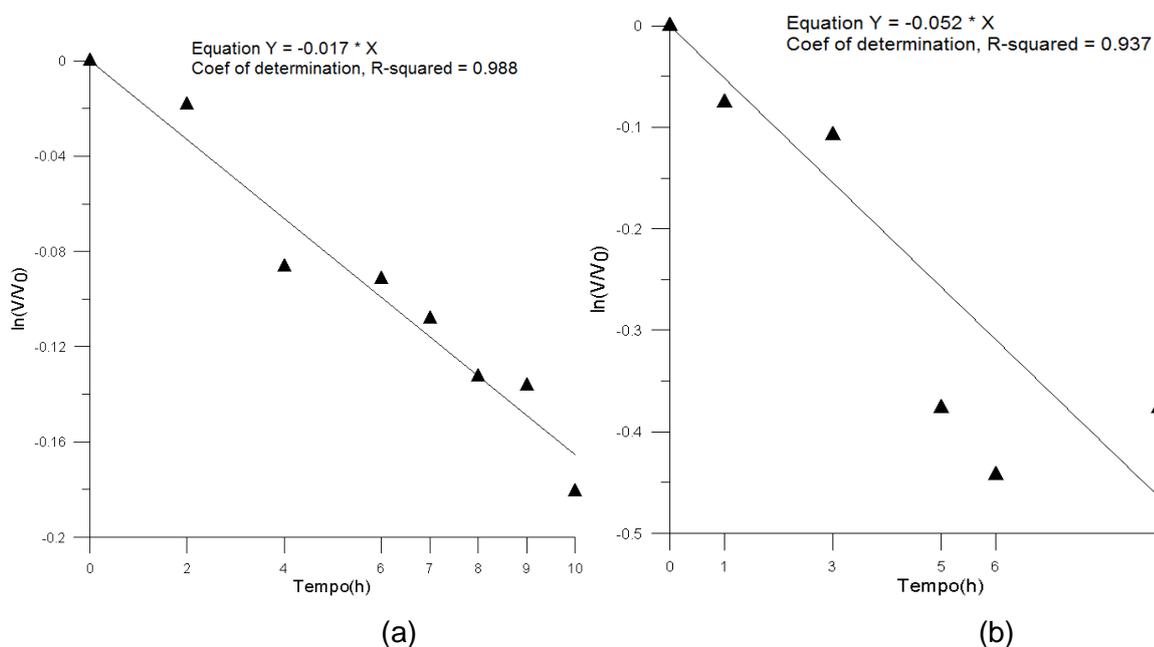


Figura 23- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 25°C de endoglucanase (a) e celulase total (b) produzidas por *T. reesei*.

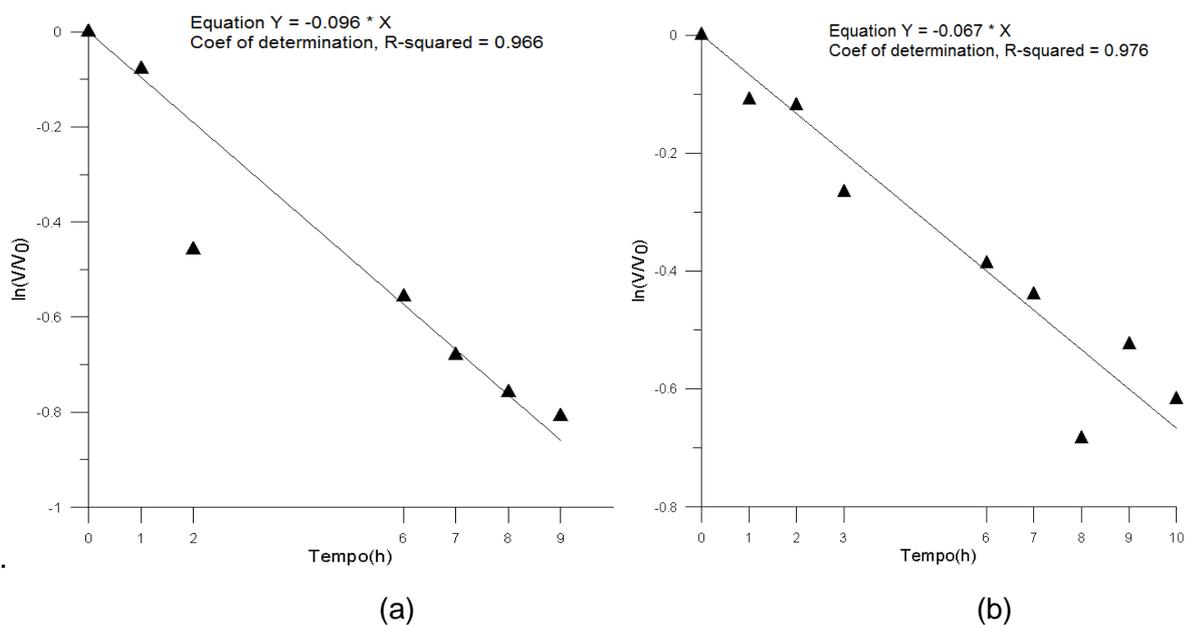


Figura 24- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 60°C de endoglucanase (a) e celulase total (b) produzidas por *T. reesei*.

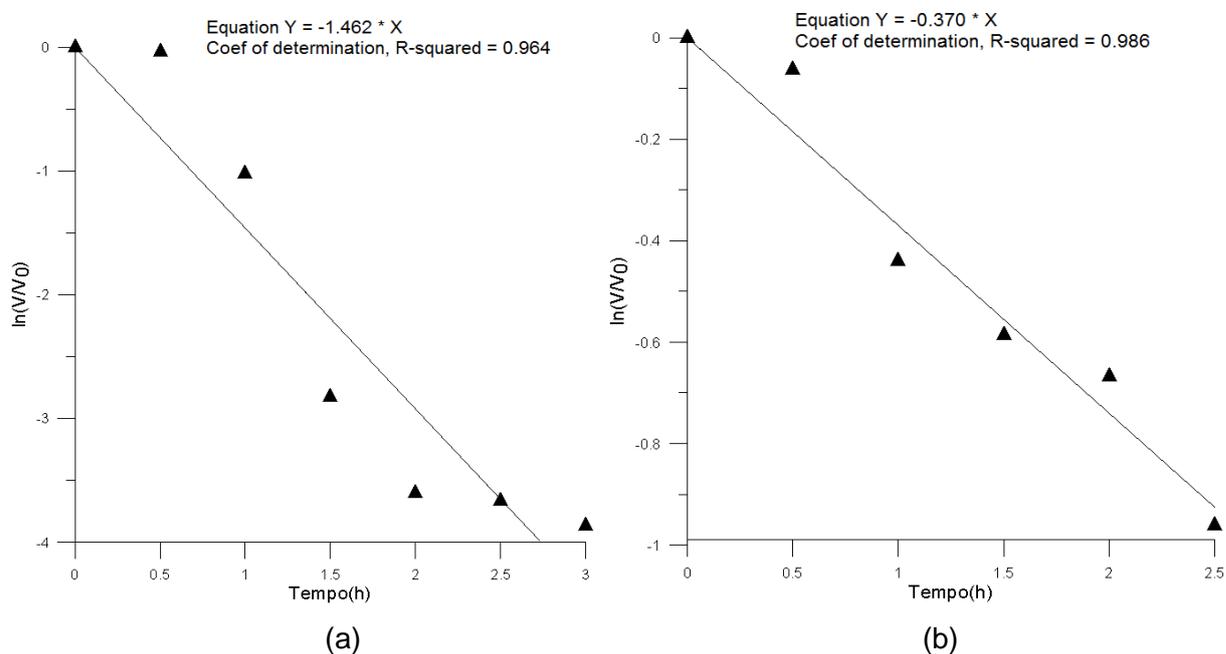


Figura 25- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 80°C de endoglucanase (a) e celulase total (b) produzidas por *T. reesei*.

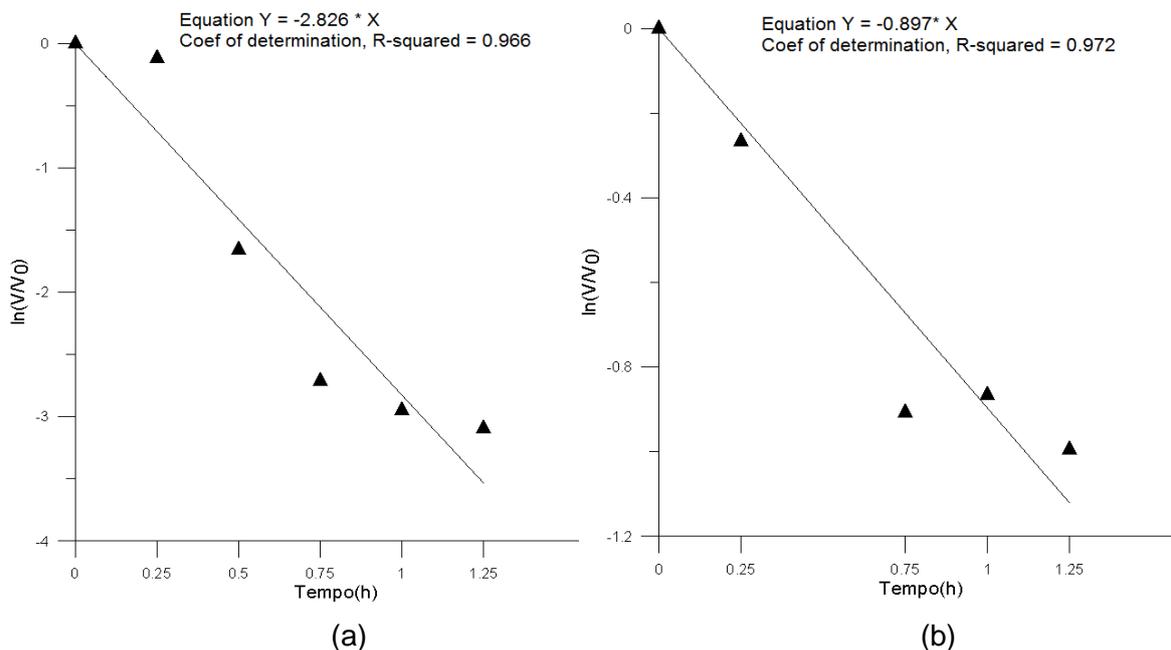


Figura 26- Dados de  $\ln(V/V_0)$  em função do tempo para cálculo da constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) a 100°C de endoglicanase (a) e celulase total (b) produzidas por *T. reesei*.

Os coeficientes angulares das retas obtidas nas Figuras acima correspondem ao valor da constante de velocidade de desnaturação enzimática ( $K_d$ ). O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), um parâmetro imprescindível quando se avalia a estabilidade enzimática foi calculado a partir da Equação 8. Nas Tabelas 34 e 35 estão descritos os valores para  $K_d$  e  $t_{1/2}$  nas diferentes temperaturas estudadas para enzimas de *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente.

Tabela 34- Resultados de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para as enzimas produzidas por *R. oryzae*

Temperatura (°C)	Endoglicanase		Celulase Total	
	$K_d$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$K_d$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
25	0,011	63,0	0,004	173,3
60	0,013	53,3	0,006	115,5
80	0,032	21,7	0,009	77,0
100	0,044	15,8	0,016	43,3

$K_d$ -constante da velocidade de desnaturação.  $t_{1/2}$ -tempo de meia vida.

Tabela 35- Resultados de  $K_d$  e  $t_{1/2}$  para as enzimas produzidas por *T. reesei*

Temperatura (°C)	Endoglicanase		Celulase Total	
	$K_d$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$K_d$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
25	0,017	40,8	0,052	13,3
60	0,096	7,2	0,067	10,3
80	1,462	0,5	0,370	1,9
100	2,826	0,2	0,897	0,8

$K_d$ -constante da velocidade de desnaturação.  $t_{1/2}$ -tempo de meia vida.

A constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) é inversamente proporcional à estabilidade térmica da enzima, ou seja, quando menor o valor de  $K_d$ , maior a estabilidade (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002). Pode-se observar que para todas as enzimas estudadas ocorreu um aumento de  $K_d$  com a elevação da temperatura e conseqüentemente o decréscimo do  $t_{1/2}$ , conforme o esperado.

As enzimas produzidas por *R. oryzae* apresentaram boa estabilidade térmica, tendo um decréscimo maior na faixa de temperatura de 80-100 °C. Entre as duas enzimas estudadas, a que apresentou maior estabilidade foi a celulase total com valores de 0,016  $h^{-1}$  e 43,3 h para  $K_d$  e  $t_{1/2}$  a 100°C.

Saqib et al. (2010), avaliaram a termoestabilidade de endoglicanase produzida por *Aspergillus fumigatus* durante fermentação em estado sólido com palha de trigo e obtiveram os valores de  $t_{1/2}$  de 5,5, 4,1, 3,2 e 0,2 h para 50, 60, 70 e 80 °C, respectivamente.

Li et al. (2003), avaliaram a produção de endocelulases por *Chaetomium thermophilum* CT 2 em meio contendo celulose micro cristalina, amido e extrato de levedura. No estudo da termoestabilidade encontraram valores de 0,75, 0,40 e 0,11 h para o  $t_{1/2}$  a 70, 80 e 90 °C, respectivamente.

Shuyan et al. (2006), extraíram uma endoglicanase termofílica de *Fusarium oxysporum* e obtiveram como  $t_{1/2}$  para as temperaturas de 60 e 70 °C, os valores de 0,35 e 0,25 h, respectivamente. Portanto, as enzimas produzidas neste trabalho se mostraram mais estáveis do que algumas enzimas obtidas a partir de outros micro-organismos. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de algumas enzimas fúngicas serem glicosiladas e devido a este fato apresentarem determinadas propriedades como maior estabilidade ao calor e desnaturantes (GRIFFIN, 1993).

De acordo com a Tabela 35, pode-se observar que as enzimas produzidas por *T. reesei* possuem uma estabilidade térmica inferior quando comparado com os

resultados obtidos para *R. oryzae*. Em temperaturas mais baixas, a endoglicanase possui maior estabilidade em relação a celulase total, ocorrendo a mudança neste comportamento a partir de 60 °C.

Os resultados encontrados indicam que estas enzimas produzidas por *T. reesei* são mais sensíveis as variações de temperatura, sendo necessário o emprego de técnicas que proporcionam o aumento da estabilidade como, por exemplo, a imobilização enzimática.

Sendo  $K_d$  uma função da temperatura de reação, para obter a energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ), foi realizada a linearização da equação de Arrhenius, conforme as Figuras 27 e 28, onde o coeficiente angular corresponde a  $E_d/R$ .

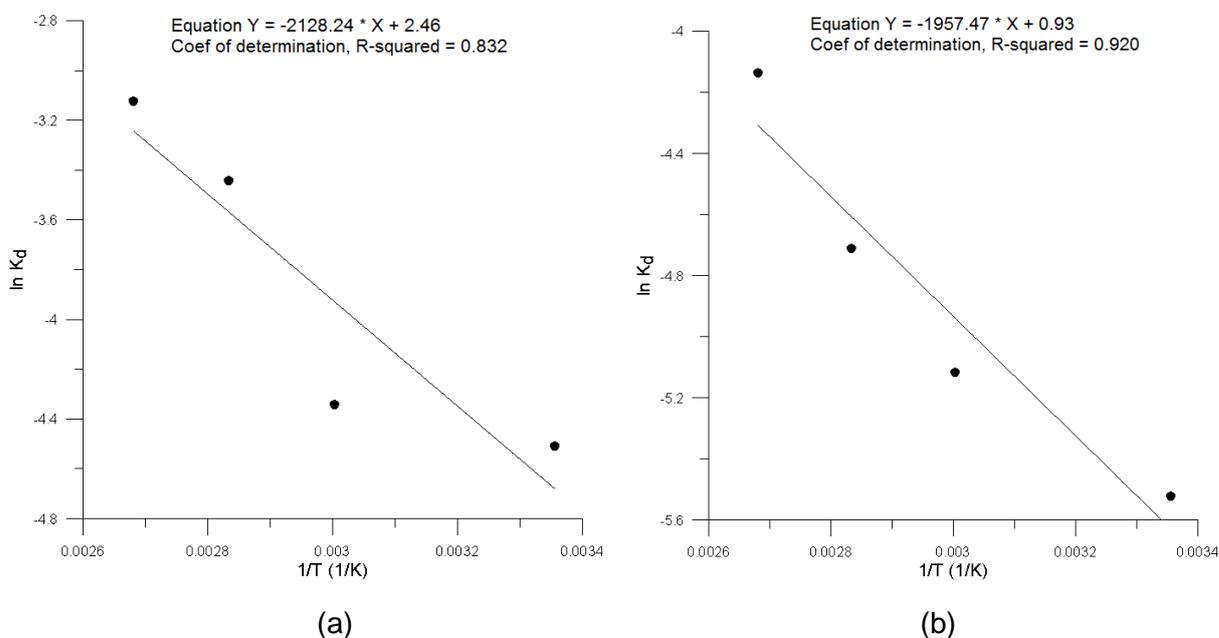


Figura 27- Constantes de desnaturação térmica  $-\ln(K_d)$  em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) da endoglicanase e celulase total produzida por *R. oryzae*.

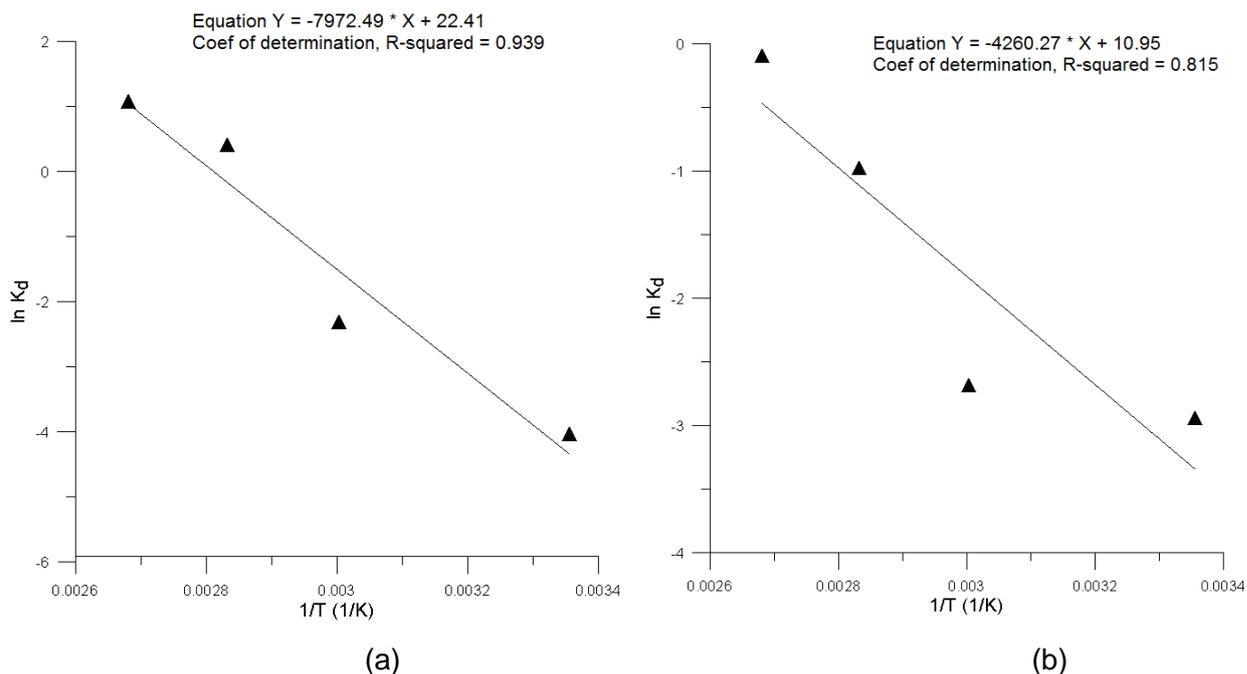


Figura 28- Constantes de desnaturação térmica  $-\ln(K_d)$  em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) da endoglicanase e celulase total produzida por *T. reesei*.

Estabelecendo  $R$  igual a  $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ , as energias de ativação da reação de desnaturação obtidas para a endoglicanase e celulase total produzidas por *R. oryzae* foram de  $17,7$  e  $16,3 \text{ KJ.mol}^{-1}$ , enquanto para *T. reesei* de  $66,3$  e  $35,4 \text{ KJ.mol}^{-1}$ , respectivamente.

As enzimas produzidas por *T. reesei* apresentaram maiores valores para  $E_d$  em relação aos resultados com *R. oryzae*. Este comportamento era esperado, pois conforme citado anteriormente, reações com alta energia de ativação proporcionam um aumento de velocidade, com o aumento da temperatura, superior as de baixa energia. Portanto, uma elevação na temperatura causa uma maior velocidade de desnaturação para as enzimas de *T. reesei*, condizente com o menor tempo de meia vida encontrado para estas enzimas.

#### 5.6.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , foi realizada somente para a endoglicanase, nas condições ótimas de reação, pois o substrato utilizado para a determinação de celulase total não permitia este estudo. Os resultados obtidos do

diagrama de Lineweaver-Burk quando plotado o inverso da atividade enzimática versus o inverso da concentração inicial de substrato estão descritos na Tabela 36.

Tabela 36- Parâmetros cinéticos da endoglicanase obtida por *R. oryzae* e *T. reesei*.

Micro-organismo	$K_M$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$V_{máx}$ (U.g <sup>-1</sup> )
<i>R. oryzae</i>	0,01	7,69
<i>T. reesei</i>	0,20	5,76

Conforme a equação de Michaelis e Mentem o  $K_M$  corresponde a concentração de substrato necessária para obter a metade da velocidade máxima, podendo também ser utilizado como medida da afinidade de determinada enzima pelo substrato (LEHNINGER, NELSON e COX, 2002).

O  $K_M$  obtido para a endoglicanase produzida por *T. reesei* foi 20 vezes superior ao encontrado para *R. oryzae*, indicando que esta endoglicanase apresenta menor afinidade pelo substrato utilizado (carboximetilcelulose). Os resultados obtidos nesse trabalho foram inferiores ao reportado na literatura, de 3,1 e 1,1 mg.mL<sup>-1</sup> para *Bacillus* e *Geobacillus*, respectivamente (RASTOGI et al., 2010); 1,15 mg.mL<sup>-1</sup> para *Penicillium purpurogenum* (LEE et al., 2010); 0,84 e 0,83 mg.mL<sup>-1</sup> para *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente (QIN et al., 2008; BEGUM e ABSAR, 2009) e 4,6 mg.mL<sup>-1</sup> para *Chaetomium thermophilum* (LI et al., 2003). Fato bastante promissor quando se pretende empregar o complexo celulolítico produzido para liberar açúcares redutores a partir de carboidratos não digeríveis.

## 6 CONCLUSÃO

O alto teor de fibras na casca de arroz (43,6 %) em relação ao farelo de arroz (6,9%) norteou a escolha do emprego de diferentes concentrações de casca. As concentrações de 1,3 e 5% estudadas mostraram que *R. oryzae* pode produzir complexo celulolítico tendo casca de arroz como fonte de carbono.

Foi verificado que as condições ótimas para produção de celulases via fermentação em estado sólido pelo *R. oryzae* ocorriam quando empregado 82,5% de casca e 17,5% de farelo de arroz como substrato, 30% de umidade inicial em biorreatores do tipo bandeja. Para *T. reesei* as condições foram 100% de casca, 50% de umidade inicial em biorreatores do tipo erlenmeyers.

O tempo de fermentação ideal para produção enzimática para *R. oryzae* ocorreu 15 h para obtenção da maior atividade celulolítica, de 0,094 e 0,206  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$  para celulase total e endoglicanase, respectivamente. Para *T. reesei* a atividade máxima foi obtida em 55 h de fermentação, sendo esta de 0,110  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$  para celulase total e 0,605  $\text{U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$  para endoglicanase. Nos dois casos atividade amilolítica e pectinolítica foram detectadas.

A temperatura ótima para atuação das enzimas celulolíticas foi de 60 °C. O pH ótimo da endoglicanase foi de 5,0 e 6,0 para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente; para celulase total este foi de 6,0 e 5,0 para *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente. As enzimas produzidas por *R. oryzae* apresentaram maior estabilidade térmica, apresentando um tempo de meia vida para endoglicanase e celulase total de 79 e 54 vezes superior as de *T.reesei*, respectivamente. Os valores de  $K_M$  de 0,01 e 0,20 mg/mL para as endoglicanases produzida por *R. oryzae* e *T. reesei*, respectivamente, indicam uma maior afinidade pelo substrato para a enzima produzida por *R. oryzae*.

Os dois micro-organismos cultivados em casca de arroz produzem complexo celulolítico promissor para hidrolisar carboidratos indigeríveis para diferentes fins. Destacando-se *Rhizopus oryzae* com menor tempo para produção e maior estabilidade enzimática apresentada, constituindo-se uma alternativa mais econômica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA**. Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de novembro de 2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 10 nov. 2010.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 379-397, 2010.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.
- ALCALDE, F. S. C. **Elucidação do destino metabólico de glicose no fungo filamentos *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequence Tags) e “microarrays” de cDNA**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2002.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 364-368, 2007.
- AMATO, G. W. **Farelo de arroz: uma nova visão**. Disponível em: < <http://www.irga.rs.gov.br> >. Acesso em: 10 nov. 2010.
- AMISSAH, J. G. N.; ELLIS, W. O.; ODURO, I.; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control**, v. 14, p. 21-24, 2003.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC**: Official Methods of Analysis of International. 17 th, 2000. 1 CD-ROM.
- BADIALE-FURLONG, E. **Bioquímica: Um enfoque para alimentos**. 1ªed. Rio Grande: EDGRAF Editora e Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande, v.1, 172p, 2000.
- BAI, Z. H.; ZHANG, H. X.; QI, H. Y.; PENG, X. W.; LI, B. J. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 49-52, 2004.

- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Influence of the trichothecenes DON and T-2 toxin in malt aminolytic enzymes activity. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 53, p. 505-511, 2010.
- BCC Research. **BCC**. Enzymes for Industrial Applications. Disponível em: < [www.bccresearch.com/chem/C147U.html](http://www.bccresearch.com/chem/C147U.html)>. Acesso em: 15 nov. 2010
- BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219-248, 1990.
- BEGUM, M. F.; ABSAR, N. Purification and characterization of intracellular cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. **Mycobiology**, v. 37, p. 121-127, 2009.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 175-184, 2005
- BHAT, M. K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BHAT, N. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BOBBIO, F. O; BOBBIO P. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 3. ed., 2003.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1. ed., 2001.
- BOTELLA, C.; ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamari* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100-106, 2005.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1889-1900, 2010.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

- CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 323-328, 2007.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB**: Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2012.
- CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Sacharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.
- COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 203 p., 1996.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211–219, 2005.
- DAL MORO, J.; ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C. S. M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum Scientia, Série: Ciências da Saúde**, v. 4, p. 33-44, 2004.
- DEDAVID, L. A. S.; LOPES, F. C.; SILVEIRA, S. T.; BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 295-305, 2009.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, vol. 2, 2001.
- DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 373-385, 2005.
- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M.; HENRIQUE, J. A. P.; FUNGARO, M. H. P.; AZEVEDO, A. C. S.; VELHO, T. A. F.; LAGUNA, S. E. Generation of recombinants strains to cellulase production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 403-409, 2008.

- EKPERIGIN, M. M. Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella sp.* **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 028-033, 2007.
- FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994.
- FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO**: Produção mundial de grãos e arroz. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/show>>. Acesso em: 08 nov. 2010.
- FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 107-115, 2003.
- FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. F.; JONAS, R. Formulation of a lactose-free, low-cost culture médium for the production of B-D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 589-593, 2000
- GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação da casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, 2001.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GOMES, F. M.; PAULA, V. P.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lípase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, p. 710-718, 2006.
- GOULART, A. J.; CARMONA, E. C.; MONTI, R. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, pp. 327-333, 2005.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. Segunda Edição, Wiley-Liss, 1993.
- GRIGOREVSKI DE LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.
- GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansiopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- GUOWEI, S.; MAN, H. U.; SHIKAI, W.; HE, C. Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 357- 361, 2011.
- HAICHAR, F. Z.; ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; MAROL, C.; MARAIS, M. F.; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESSENT, J.; BERGE, O. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 625-634, 2007.
- HALTMEIER, T.; LEISOLA, M.; ULMER, D.; WALDNER, R.; FIECHTER, A. Pectinase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p. 1685-1690, 1983.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, p. 56, 1982.
- HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 162-168, 2011.
- HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421-430, 2000.
- IYAYI, E. A. Changes in the cellulose, sugar and crude protein contents of agro-industrial by-products fermented with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium sp.* **African Journal of Biotechnology**, v.3, p. 186-188, 2004.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization- Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.

- JABASINGH, S. A. Utilization of pretreated coir pith for the optimized bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 1150-1160, 2011.
- JABASINGH, S. A.; VALLINACHIYAR, C. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 85-97, 2011.
- JOSHI, C. P.; MANSFIELD, S. D. The cellulose paradox- simple molecule, complex biosynthesis. **Current Opinion Plant Biology**, v. 10, p. 220-226, 2007.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, pp. 539-550, 2000.
- KARLSON, P.; PULIDO, F. **Manual de Bioquímica**. Barcelona: Editorial Marín, 2 ed., 1967.
- KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglycanase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 74-81, 2007.
- KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1083-1089, 2011.
- KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
- KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701-1705, 2005.
- LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3634-3637, 2007.
- LEE, K. M.; JEYA, M.; JOO, A. R.; SINGH, R.; KIM, I. W.; LEE, J. L. Purification and characterization of a thermostable endo-b-1,4-glucanase from a novel strain of

*Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 206-211, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 3.ed, 2002.

LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocelluloses using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7083-7087, 2010.

LI, D. C.; LU, M.; LI, Y. L.; LU, J. Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 932-937, 2003.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E. BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial- Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v.3, 2001.

LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017. **New Biotechnology**, v. 28, p. 733-737, 2011.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, pp. 265-275, 1951.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; FENDRICH, R. C.; BIANCA, B. E. D.; HAMINIUK, C. W. I.; SOCCOL, C. R. Study of Some Parameters which Affect Xylanase Production: Strain Selection, Enzyme Extraction Optimization, and Influence of Drying Conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 748-755, 2009.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v.99, p. 1729-1735, 2008.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

- MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1424, 2008.
- MARZZOCCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- MEKALA, N. K.; SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 122-131, 2008.
- MELO, I. S. **Trichoderma e Gliocladium como Bioprotetores de Plantas**. In: LUZ, W. C. (ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo – R.S., EMBRAPA, 4 p. 261 – 295, 1996.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 68-78, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-429, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.
- MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. **Biosource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.
- MURASHIMA, K.; NISHIMURA, T.; NAKAMURA, Y.; KOGA, J.; MORIYA, T.; SUMIDA, N.; YAGUCHI, T.; KONO, T. Purification and characterization of new endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 319-326, 2002.
- MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v.41, p. 28-33, 2007.
- NATIONAL ORGANIC STANDARDS BOARD. **NOSB: Enzymes, Plant and Fungal**, 1999. Disponível em <[http://www.omri.org/Enzymes\\_processing.pdf](http://www.omri.org/Enzymes_processing.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2010.
- NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**. São Paulo: Nobel S.A., 1992.
- NG, T. B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, v. 25, p. 1055-1073, 2004.

NIRANJANE, A. P.; MADHOU, P.; STEVENSON, T. W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1464-1468, 2007.

NITZKE, J. A.; BIEDRZYCKI, A. **Terra de Arroz**. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/alimentus/terradearroz/grao/gr\\_casca.htm](http://www.ufrgs.br/alimentus/terradearroz/grao/gr_casca.htm)>. Acesso em: 20 dez. 2011.

NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F.; MAW, T.; TAN, T. K.; KHOR, E.; WONG, S. M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 235-237, 2002.

OLIVEIRA, M. S. **Disponibilização de compostos funcionais em farelo de arroz fermentado em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA- Journal of Food**, v. 8, p. 229-236, 2010.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, p. 37-45, 2003.

PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

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

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.

PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S., 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.

PASTORE, G. M. **Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas**. In: Seminário Brasileiro de Biotecnologia enzimática, 5., 2002, Anais... Brasília, DF, 2002.

PATIL, S. V.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D. PELCZAR, M. F.. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Pearson, 2ª ed, 2010.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglycanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2107-2111, 2002.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic & Professional, 2ª ed., 1997.

PRAKASH, B.; VIDYASAGAR, M.; MADHUKUMAR, M. S.; MURALIKRISHNA, G.; SREERAMULU, K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 210-215, 2009.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2ª ed., 2004.

QIN, Y.; WEI, X.; SONG, X.; QU, Y. Engineering endoglycanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 190-195, 2008.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-15, 1998.

RAMANA MURTHY, M. V.; KARANTH, N. G.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99-147, 1993.

RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. P.; CHRISTOPHER, L. P.; SANI, R. K. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8798-8806, 2010.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, Vol. 3, 2000.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 161p., 2010.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 61-66, 2010.

- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial.** Tese (Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, 126p., 2009.
- SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKIL, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two  $\alpha$ -amylases isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 18-25, 2012.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 416 p., 2004.
- SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90p., 2005.
- SANTOS, S. F. M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 10, p. 101-109, 2008.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P, BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.115, 2011.
- SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglycanase from *Aspergillus fumigates* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641-646, 2010.
- SEHNEM, N. T.; BITTENCOURT, L. R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 163-167, 2006.
- SHIBUYA, H.; KIKUCHI, T. Purification and characterization of recombinant endoglycanases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 1325-1332, 2008.
- SHUYAN, L.; XINYUAN, D.; XUEMEI, L.; PEIJI, G. A novel thermophilic endoglycanase from a mesophilic fungus *Fusarium oxysporum*. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, p. 191-197, 2006.

- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.
- SILVA, J. C.; GOUBEIA, E. R. Algumas propriedades de endoglicanases produzidas por *Streptomyces* spp. Em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, pp. 60-70, 2008.
- SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, p. 1-44, 1995.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SOCOL, C. R.; ILOKI, I.; MARIN, B.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Comparative Production of Amylase and Protein Enrichment of Raw and Cooked Cassava by *Rhizopus* Strains in Submerged and Solid State Fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 320-323, 1994.
- SONG, P.; LI, S.; DING, Y.; XU, Q.; HUANG, H. Expression and characterization of fumarase (FUMR) from *Rhizopus oryzae*. **Fungal Biology**, v. 115, p. 49-53, 2011.
- SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas alfa-amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005
- SUN, W. C.; CHENG, C. H.; Lee, W. C. Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1083-1087, 2008.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007
- VILLEN, R. A. **Biotechnologia: histórico e tendências**. Disponível em: <<http://www.hottopos.com>>. Acesso em: 05 nov. 2010.
- VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; MACRAE, A.; BON, E. P. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulase production by *Streptomyces viribrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 256-267, 2011.

- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.
- WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1184-1192, 2008.
- WEBER, J.; AGBLEVOR, F. A. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 669-676, 2005.
- YANG, C. Y.; SHEIH, I. C.; FANG, T. J. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.11.015, 2011.
- YOON, J. J.; CHA, C. J.; KIM, Y. S.; KIM, W. Degradation of cellulose by the major endoglycanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1373-1378, 2008.
- ZENG, G. M.; SHI, J. G.; YUAN, X. Z.; LIU, J.; ZHANG, Z. B.; HUANG, G. H.; LI, J. B.; XI, B. D., LIU, H. L. Effects on Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1451-1456, 2006.
- ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G.; LIU, D. Microwave pretreatment of substrates for cellulase production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1557-1571, 2010.