

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

JANAINA MARQUES DE ALMEIDA

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE  $\beta$ -GLICOSIDASES:  
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E SUA APLICAÇÃO  
NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA

GUARAPUAVA

2014

JANAINA MARQUES DE ALMEIDA

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE  $\beta$ -GLICOSIDASES:  
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E SUA APLICAÇÃO  
NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Knob

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patricia Carla Giloni de Lima

GUARAPUAVA

2014

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

A447s

Almeida, Janaina Marques de

Seleção de fungos filamentosos produtores de B-glicosidases: produção, caracterização bioquímica e sua aplicação na hidrólise de biomassa / Janaina Marques de Almeida. -- Guarapuava, 2014  
xii, 131 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em associação ampla com Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2014

Orientadora: Adriana Knob

Co-orientadora: Patrícia Carla Giloni de Lima

Banca examinadora: Márcio Barreto Rodrigues, Mario Antônio Alves da Cunha

Bibliografia

1. Biologia evolutiva. 2. B-glicosidases. 3. Casca de maracujá. 4. Farelo de canola. 5. Fungos filamentosos. 6. Sacarificação. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 589.2

## AGRADECIMENTOS

A prof. Dra. Adriana Knob agradeço toda dedicação, disponibilidade em me orientar, pela amizade, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de trabalharmos juntas.

A prof. Dra. Patricia Carla Giloni de Lima obrigado por ter acreditado em mim quando aceitou me orientar, pela amizade, pela dedicação e pelo incentivo em todas as etapas deste trabalho.

Ao prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima por todos os ensinamentos, e contribuições a este trabalho, principalmente na parte de estatística, sem o seu apoio à realização deste trabalho não seria possível.

A minha mãe Valéria, a meus irmãos Josiane e Alexandre, e minhas sobrinhas Ana Carolina e Maria Júlia por todo o apoio, paciência e carinho.

Ao meu namorado Jean por me apoiar nesta etapa e estar sempre pronto a me ajudar e principalmente por me encorajar a seguir em frente.

A Diana, Simone, Thaianne, Regina, Andréia, Denise, Thaís e Márcio, meus colegas de laboratório pela ajuda, companheirismo e amizade.

A Recitech Ambiental por ter me concedido o afastamento para a realização deste trabalho.

A prof. Herta Stutz Dalla Santa pelos conselhos, por disponibilizar os resíduos usados neste trabalho e o laboratório para processamento dos resíduos.

A todos os professores do Programa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste por fazerem parte da minha formação profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro.

## Resumo

As  $\beta$ -glicosidases microbianas têm recebido grande atenção nos últimos anos, em razão de seu amplo espectro de aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de bioetanol, a liberação de aromas em processos vinícolas, na indústria de sucos, na síntese de oligossacarídeos e de glicoconjugados, entre outras. Neste estudo, a seleção de fungos filamentosos produtores de  $\beta$ -glicosidases e de resíduos indutores desta enzima foram realizados, sendo testados nove espécies fúngicas e três resíduos agroindustriais: casca de maracujá, casca de café e farelo de canola. Após a seleção, o efeito de diversos parâmetros físico-químicos sobre a produção de  $\beta$ -glicosidases pelos fungos *Penicillium verrucosum* e *Trichoderma viride* (os melhores produtores) foram investigados, empregando-se os resíduos de casca de maracujá e farelo de canola (melhores resíduos indutores) como substratos. As  $\beta$ -glicosidases foram caracterizadas bioquimicamente e os extratos enzimáticos obtidos foram empregados no processo de sacarificação da casca de maracujá, no intuito de maximizar a liberação de glicose. Os experimentos foram realizados em Delineamento Central Composto Rotacional aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta. A simulação dos dados foi realizada como ferramenta auxiliar na obtenção dos fatores ótimos. Dentre as linhagens fúngicas avaliadas, *P. verrucosum* foi a que produziu os maiores níveis de  $\beta$ -glicosidase, quando cultivada em presença da casca de maracujá. Níveis máximos de produção foram alcançados em pH ajustado para 4,2, concentração do substrato de 2,9 % e o tempo de cultivo de 8,6 dias, correspondendo a  $8,54 \text{ U mL}^{-1}$ . Os maiores índices de liberação de glicose a partir da hidrólise da casca de maracujá foram obtidos por meio da aplicação do extrato bruto de *T. viride*. As melhores condições de hidrólise estabelecidas foram 96 horas de incubação, temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5,0 e concentração enzimática equivalente a  $22,5 \text{ U g}^{-1}$  de substrato. A casca de maracujá se mostrou uma matéria-prima promissora para produção de  $\beta$ -glicosidases, bem como para a produção de monômeros de glicose através da hidrólise enzimática, além de ser um material de baixo custo e gerado em grandes quantidades em indústrias de sucos. Adicionalmente, as  $\beta$ -glicosidases produzidas por ambos os fungos apresentam propriedades desejáveis como termoestabilidade e tolerância à glicose, as quais favorecem suas aplicações em diversos processos industriais.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glicosidases, casca de maracujá, farelo de canola, fungos filamentosos, sacarificação.

## Abstract

Microbial  $\beta$ -glucosidases have received great attention in recent years due to its wide spectrum of biotechnological applications, including the bioethanol production, the aroma improvement in wine processes and the juice industry, the oligosaccharides and glycoconjugates synthesis, and others. In this study, selection of filamentous fungi producers of  $\beta$ -glucosidase and waste inducers of this enzyme was performed, nine fungal species and three agro-industrial: passion fruit peel, coffee husk and canola meal, waste were tested. After selection, the effect of various physicochemical parameters on  $\beta$ -glucosidase production by the fungus *Penicillium verruculosum* and *Trichoderma viride* was investigated, using passion fruit peel waste and canola meal as substrates. The  $\beta$ -glucosidases were characterized biochemically and enzyme extracts were used in the process of passion fruit peel saccharification, in order to maximize the glucose release. The experiments were carried out using a central composite rotational design applicable to the response surface methodology. The simulation data was conducted to assist in obtaining the optimum factors. Among the evaluated fungal strains, *P. verruculosum* produced the highest levels of  $\beta$ -glucosidase, when grown in the passion fruit peel presence. Maximum production levels have been achieved when the culture medium was adjusted to pH 4.2, the concentration of the substrate was 2.9 % and the cultivation time was 8.6 days, corresponding to 8.54 U ml<sup>-1</sup>. The highest rates of glucose release from the passion fruit peel hydrolysis were obtained by applying the *T. viride* crude extract. The best hydrolysis conditions were established as 96 hours of incubation, at 60 °C, pH 5.0 and enzyme concentration equivalent to 22.5 U g<sup>-1</sup> of substrate. The passion fruit peel is shown a promising raw material for the production of  $\beta$ -glucosidases as well for the glucose production by enzymatic hydrolysis due to be a low cost material and generated in large quantities in juice industries. In addition, the  $\beta$ -glucosidases produced by both fungi show interesting properties, such as thermostability and glucose tolerance, which favors their applications in various industrial processes.

**Key-words:**  $\beta$ -glucosidase, passion fruit peel, canola meal, filamentous fungi, saccharification.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da estrutura química das principais moléculas da parede celular vegetal.....	17
<b>Figura 2.</b> Modelo esquemático da formação de fibrilas na parede celular de uma célula vegetal.....	18
<b>Figura 3.</b> Mapa do Brasil apresentando o potencial para produção de celulases por resíduos agroindustriais. ....	20
<b>Figura 4.</b> Produção mundial de grão de canola, safra 2012/2013 (A). Produção mundial de óleos vegetais, safra 2012/2013 (B). ....	23
<b>Figura 5.</b> Figura esquemática da ação das diferentes celulases sobre a celulose. ....	26
<b>Figura 6.</b> Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose após o pré-tratamento. ....	28
<b>Figura 7.</b> Modelo esquemático da hidrólise da celulose. ....	30
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do processo de amorfogênese ....	31
<b>Figura 9.</b> Modelo de clivagem por mecanismo catalítico oxidativo da celulose.....	31
<b>Figura 10.</b> Modelo esquemático atual do processo de degradação enzimática da celulose por fungos. ....	32
<b>Figura 11.</b> Morfologia macroscópica de culturas de <i>T. viride</i> , em meio Vogel.....	38
<b>Figura 12.</b> Micromorfologia de <i>T. viride</i> .....	38
<b>Figura 13.</b> Estrutura molecular da alameticina.....	39
<b>Figura 14.</b> Morfologia macroscópica de cultura de <i>P. verruculosum</i> , em meio ágar Sabouraud.....	41
<b>Figura 15.</b> Micromorfologia de <i>P. verruculosum</i> .....	42
<b>Figura 16.</b> Estrutura química do verrucologeno.....	43
<b>Figura 17.</b> Estrutura química do ácido decalpenico. ....	43
<b>Figura 18.</b> Estrutura química de verrulactones.....	43
<b>Figura 19.</b> Visualização gráfica de um planejamento composto central para $q = 2$ fatores. ....	46

### Capítulo I

<b>Figura 1.</b> Superfície de resposta para a produção de $\beta$ -glicosidase.....	63
<b>Figura 2.</b> Simulação de dados para atividade de $\beta$ -glicosidase ....	66
<b>Figura 3.</b> Influência da temperatura (A), pH (B), estabilidade térmica (C) e estabilidade de pH (D) na atividade enzimática de $\beta$ -glicosidase de <i>P.verruculosum</i> . ....	68

<b>Figura 4.</b> Efeito da glicose na atividade da $\beta$ -glicosidase de <i>P. verruculosum</i> . .....	71
<b>Figura 5.</b> Superfície de resposta para liberação de glicose.....	72
<b>Figura 5.</b> Superfície de resposta para liberação de glicose.....	72
<b>Figura 6.</b> Simulação dos dados de liberação de glicose .....	77

## Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Superfície de resposta para a atividade de $\beta$ -glicosidase .....	94
<b>Figura 2.</b> Simulação de dados da atividade de $\beta$ -glicosidase .....	97
<b>Figura 3.</b> Influência da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) e estabilidade de pH (D) na atividade enzimática de $\beta$ -glicosidase de <i>T. viride</i> .....	99
<b>Figura. 4.</b> Efeito da concentração de glicose na atividade da $\beta$ -glicosidase de <i>T. viride</i> . .....	102
<b>Figura 5.</b> Superfície de resposta para liberação de glicose.....	103
<b>Figura. 6.</b> Simulação de dados da concentração de glicose.....	108



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de alguns tipos de biomassa lignocelulósica em %.	19
<b>Tabela 2.</b> Composição centesimal da farinha da casca de maracujá.	22
<b>Tabela 3.</b> Composição do farelo de canola canadense.	24
<b>Tabela 4.</b> Produção de $\beta$ -glicosidase por diferentes fungos cultivados em diferentes fontes de carbono.	49

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de $\beta$ -glicosidase por <i>P. verruculosum</i> .	59
<b>Tabela 2.</b> Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para $\beta$ -glicosidase produzida por <i>P. verruculosum</i> cultivado em casca de maracujá e farelo de canola, e os valores de $R^2$ e <i>F</i> -valor.	60
<b>Tabela 3.</b> Efeito de diferentes substâncias na atividade de $\beta$ -glicosidase de <i>P. verruculosum</i> .	69
<b>Tabela 4.</b> Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para hidrólise enzimática da casca de maracujá com a liberação de glicose.	73
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir de casca de maracujá hidrolisada por extrato bruto de <i>P. verruculosum</i> , e os valores de $R^2$ e <i>F</i> -valor.	74

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de $\beta$ -glicosidase por <i>T. viride</i> .	90
<b>Tabela 2.</b> Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para as $\beta$ -glicosidases produzidas por <i>T. viride</i> cultivado em casca de maracujá e farelo de canola, e os valores de $R^2$ e <i>F</i> -valor.	91
<b>Tabela 3.</b> Efeito de diferentes substâncias na atividade de $\beta$ -glicosidase de <i>T. viride</i> .	100
<b>Tabela 4.</b> Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para hidrólise enzimática da casca de maracujá com liberação de glicose.	104
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir de casca de maracujá hidrolisada por extrato bruto de <i>T. viride</i> , e os valores de $R^2$ e <i>F</i> -valor.	105

## LISTA DE SIGLAS

**$\beta$** : Beta

**°C**: graus Celsius

**DCCR**: Delineamento Central Composto Rotacional

**EDTA**: ácido etilenodiaminotetracético

**g**: grama

**g/g**: grama por grama

**gl**: grau de liberdade

**g L<sup>-1</sup>**: grama por litro

**ha**: hectare

**M**: modelo

**M**: molar

**mM**: milimolar

**mg**: miligrama

**mg mL<sup>-1</sup>**: miligramas por mililitros

**mg/g**: miligramas por grama

**min**: minutos

**mL**: mililitros

**MQ**: média dos quadrados

**K<sub>i</sub>**: coeficiente de inibição

**pH**: potencial hidrogeniônico

**PNPG**: *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo

**R**: resíduo

**rpm**: rotações por minuto

**MSR**: Metodologia de Superfície de Resposta

**SDS**: dodecil sulfato de sódio

**SQ**: soma dos quadrados

**T**: Total

**T<sub>1/2</sub>** - meia vida

**U**: Unidade enzimática

**U mL<sup>-1</sup>**: Unidades por mililitros

**v/v**: volume por volume

**$\mu$ L**: microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1 Matérias-Primas Lignocelulósicas .....	16
3.2 Resíduos Agroindustriais .....	18
3.2.1 Resíduos de Maracujá .....	21
3.2.2 Resíduos de Canola .....	22
3.3 Enzimas Celulolíticas .....	25
3.4 Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos .....	27
3.5 Microrganismos Produtores de Celulases.....	32
3.6 As $\beta$ -glicosidases e suas Aplicações .....	34
3.7 O Gênero <i>Trichoderma</i> e a Espécie <i>Trichoderma viride</i> .....	35
3.8 O Gênero <i>Penicillium</i> e a Espécie <i>Penicillium verruculosum</i> .....	40
3.9 Metodologia de Superfície de Resposta.....	44
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
4.1 Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de $\beta$ -Glicosidases Empregando-se Resíduos Agroindustriais como Substrato .....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1 Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de $\beta$ -Glicosidases Empregando-se Resíduos Agroindustriais como Substrato .....	49
<b>CAPÍTULO I</b> .....	51
<b>Resumo</b> .....	51
<b>1. Introdução</b> .....	52
<b>2. Material e Métodos</b> .....	54
2.1 Microrganismo e Condições de Cultivo .....	54
2.2 Determinação da Atividade Enzimática e Proteínas Totais.....	54
2.3 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	55
2.4 Caracterização Enzimática.....	55
2.4.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase .....	55

2.4.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e pH .....	56
2.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase	56
2.4.4 Determinação do $K_i$ .....	56
2.5 Hidrólise Enzimática da Casca de Maracujá .....	57
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>58</b>
3.1 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) .....	58
3.1.1 Validação do Modelo .....	64
3.1.2 Simulação de Dados .....	64
3.2 Caracterização Enzimática .....	66
3.2.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase .....	66
3.2.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Diferentes Valores de pH .....	67
3.2.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase	68
3.2.4 Tolerância a Glicose .....	70
3.3 Hidrólise Enzimática .....	71
3.3.1 Validação do Modelo .....	75
3.3.2 Simulação de Dados .....	76
<b>4. Conclusão</b> .....	<b>78</b>
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>83</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>83</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>84</b>
<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>85</b>
2.1 Microorganismo e Condições de Cultivo .....	85
2.2 Determinação da Atividade Enzimática e Proteínas .....	85
2.3 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) .....	86
2.4 Caracterização Enzimática .....	86
2.4.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase .....	86
2.4.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Valores de pH .....	87
2.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase	87
2.4.4 Determinação do $K_i$ .....	87
2.5 Hidrólise Enzimática da Casca de Maracujá .....	88

<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	89
3.1 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	89
3.1.2 Validação do Modelo .....	95
3.1.3 Simulação de Dados .....	95
3.2 Caracterização Enzimática.....	97
3.2.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase .....	97
3.2.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Diferentes Valores de pH.....	98
3.2.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase.....	99
3.2.4 Tolerância a Glicose.....	101
3.3 Hidrólise Enzimática.....	102
3.3.1 Validação do Modelo .....	106
3.3.2 Simulação de Dados .....	107
<b>4. Conclusões</b> .....	109
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	110
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	114
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	115
<b>APÊNDICE A – Tabelas de estatística descritiva</b> .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

A sociedade mundial enfrenta um grave problema de esgotamento dos recursos energéticos baseados em fontes não renováveis. Em contrapartida, o consumo de energia cresce progressivamente. O uso de combustíveis fósseis leva ao aumento de gases poluentes na atmosfera, conduzindo a mudanças no clima global. Assim, uma das alternativas para essa questão é o uso de fontes renováveis de energia (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008), destacando-se a produção de etanol a partir de fontes celulósicas ou amiláceas.

Os recursos renováveis mais abundantes do planeta são os resíduos agroindustriais, gerados em grandes quantidades durante o ano todo, os quais são originados durante o processamento industrial dos produtos agrícolas. Devido à sua ampla disponibilidade e rica composição, estes materiais têm grande potencial para utilização em processos de aproveitamento de resíduos, como matéria-prima de baixo custo, gerando expressivos ganhos ambientais e econômicos (BHATIA et al., 2012).

Dentro deste contexto, um dos setores promissores para utilização de resíduos agroindustriais é a produção de enzimas e a hidrólise enzimática destes materiais para produção de biocombustíveis e outros químicos de interesse industrial. De acordo com Castro e Castro (2012), o Brasil apresenta potencial para se tornar um grande gerador de produtos biotecnológicos, devido a sua grande diversidade e suas características ambientais, as quais proporcionam a obtenção de uma ampla variedade de resíduos agroindustriais.

Dentre as enzimas envolvidas no processo de hidrólise da biomassa, as celulasas têm sido as mais investigadas. Estas enzimas são classificadas de acordo com seu modo de ação em endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. As enzimas celulolíticas possuem diversas aplicações biotecnológicas, nos mais variados segmentos, porém seu custo de produção ainda é elevado. Por esta razão, a procura por novas formas de se produzir estas enzimas é bastante promissora, sendo particularmente interessante o uso de novos microorganismos e de resíduos agroindustriais como fontes de carbono, no intuito de reduzir os custos de produção, bem como os impactos ambientais causados pela disposição inadequada destes materiais (CHAUVE et al., 2010)

No processo de degradação de materiais lignocelulósicos, as  $\beta$ -glicosidases são consideradas as enzimas limitantes. As  $\beta$ -glicosidases são responsáveis pela catálise da última etapa para liberação da glicose e, por esta razão, regulam a atividade das endoglucanases e exoglucanases (SINGHANIA et al., 2013). Atualmente, grande parte da produção das  $\beta$ -

glicosidases é realizada com o emprego de fungos filamentosos, uma vez que são eficientes em secretar as enzimas hidrolíticas diretamente no meio de cultivo, facilitando a sua recuperação (POLIZELI et al., 2005).

Diante do exposto acima, o objetivo deste estudo foi selecionar fungos com alta produtividade de  $\beta$ -glicosidases, estabelecer os parâmetros físico-químicos ótimos para a produção desta enzima por *Penicillium verruculosum* e *Trichoderma viride*, cultivados em resíduos agroindustriais. E por meio do uso dos extratos brutos produzidos por estes fungos, o processo de hidrólise enzimática da casca de maracujá foi otimizado, no intuito de maximizar a liberação de glicose. Adicionalmente, as  $\beta$ -glicosidases produzidas foram caracterizadas bioquimicamente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi selecionar fungos filamentosos produtores de  $\beta$ -glicosidases, estabelecer as melhores condições físico-químicas para a produção destas enzimas, bem como caracterizá-las bioquimicamente. Adicionalmente, a aplicação das enzimas produzidas no processo de hidrólise da biomassa foi avaliada.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar fungos filamentosos com potencial para a produção de  $\beta$ -glicosidases, empregando-se a casca de maracujá e o farelo de canola como fontes de carbono;
2. Estabelecer os parâmetros físico-químicos ótimos para a produção de  $\beta$ -glicosidases pelos fungos selecionados, utilizando o delineamento central composto rotacional aplicável à metodologia de superfície de resposta;
3. Determinar o pH e a temperatura ótimos da atividade enzimática, bem como verificar a estabilidade das  $\beta$ -glicosidases frente à temperatura e ao pH;
4. Avaliar o efeito de íons metálicos e de outras substâncias, assim como da glicose sobre a atividade das enzimas produzidas;
5. Estabelecer as melhores condições de hidrólise enzimática da casca de maracujá, por meio do uso do delineamento central composto rotacional aplicável à metodologia de superfície de resposta.

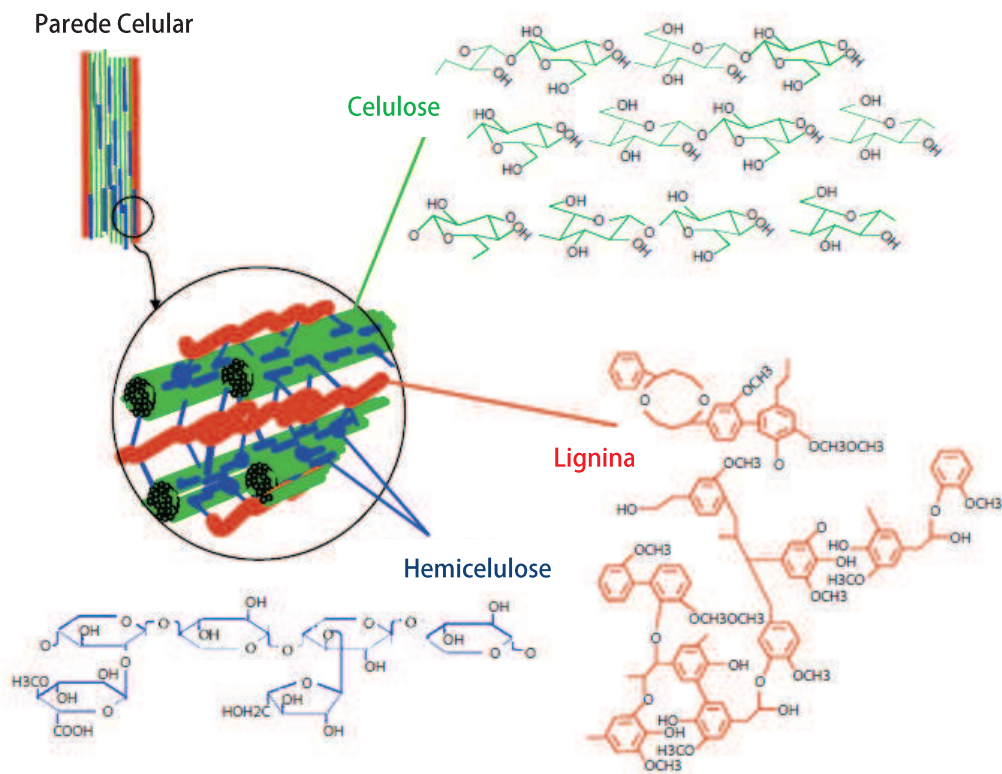


### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Matérias-Primas Lignocelulósicas

O interesse na utilização de resíduos lignocelulósicos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, por serem recursos renováveis, gerados em grandes proporções, apresentando, desta forma, grande potencial como alternativa para geração de energia. Nos últimos anos, um avanço significativo na área de biotecnologia destes materiais foi observado, sendo este impulsionado pela economia mundial, pela limitada fonte de energia fóssil, bem como pela preocupação em se utilizar fontes de energia mais limpas (IQBAL et al., 2013). Porém, o maior desafio ainda é desenvolver tecnologias capazes de converter a biomassa em açúcares fermentáveis a um custo rentável e competitivo com as tecnologias de produção convencionais de etanol. No entanto, esta eficiência e rentabilidade é difícil de ser atingida pela estrutura e composição da biomassa lignocelulósica, que requer tanto tratamentos complexos, quanto alto consumo de energia, que resulta em aumento do custo (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

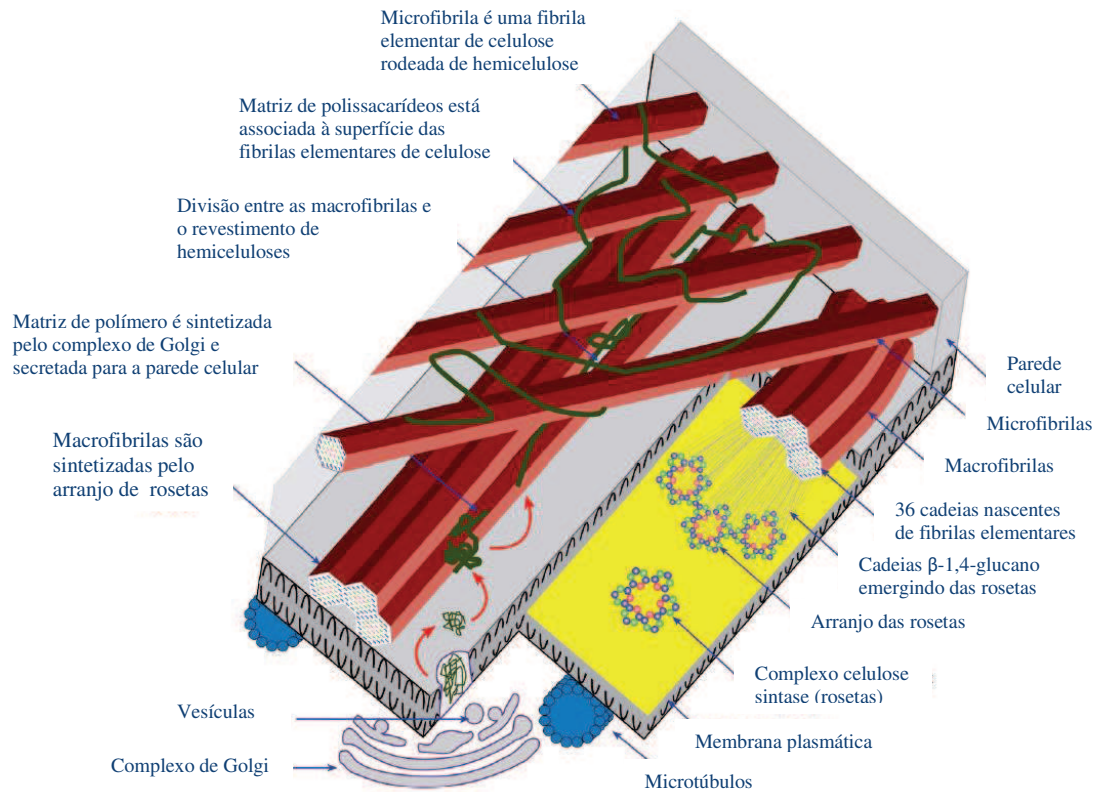
Os materiais lignocelulósicos são formados por três tipos principais de moléculas: a celulose, a hemicelulose e a lignina, as quais compõem a parede vegetal, tendo esta última função estrutural e de proteção (SWEENEY; XU, 2012; BHATIA et al., 2012). A estrutura química da parede celular vegetal está representada na Figura 1. A celulose é um polímero de unidades glicosídicas, que estabelecem interações físico-químicas com a lignina e hemicelulose. Este polissacarídeo é formado por longas microfibrilas, que interagem por meio de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, resultando em numerosos agregados cristalinos (GLAZER; NIKAIDO, 2007; SÁNCHEZ, 2009). Em escala nanométrica, as microfibrilas estão congregadas em uma rede polimérica de hemicelulose, pectina e lignina, o que explica, em parte, a recalcitrância da biomassa frente à degradação (YARBROUGH et al., 2009). As redes de microfibrilas celulósicas denominam-se macrofibrilas, as quais estão organizadas em lamelas para formar uma estrutura fibrosa de muitas camadas na parede celular vegetal (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Desta forma, a biomassa celulósica possui domínios cristalinos separados por regiões menos ordenadas (regiões amorfas), sendo estas últimas os pontos estratégicos para início da hidrólise, visto serem mais acessíveis às enzimas. Contrariamente, a estrutura cristalina da celulose confere resistência à hidrólise química e enzimática, pois as cadeias de celodextrinas estão rigorosamente organizadas (ADSUL et al., 2011).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura química das principais moléculas da parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de Kowsari (2014).

A formação de fibrilas na parede celular vegetal está representada na Figura 2, onde são necessárias pelo menos três tipos de celulose sintases, as quais se organizam em forma de rosetas 6x6 para montar as microfibrilas. Assim, cada roseta sintetiza 36 cadeias de fibrilas elementares de celulose (YANG et al., 2011).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, logo depois da celulose (LUO et al., 2012). Esses polissacarídeos são heteropolímeros de cadeias curtas altamente ramificadas, formados principalmente por xilose, glicose, manose, galactose, arabinose e ácido urônico. São comumente chamados de xilanos, galactanos ou mananos, dependendo do açúcar predominante na sua estrutura. Os carbonos 5 e 6 dos açúcares são unidos por meio de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,6 e  $\beta$ -1,4 e frequentemente apresentam-se acetilados formando uma estrutura solta, hidrofílica, promovendo a adesão entre a celulose e a lignina (ADSUL et al., 2011). Como a hemicelulose possui moléculas de açúcares, estas podem agir como regiões de reconhecimento para os microrganismos iniciarem a degradação dos resíduos hemicelulósicos (ROWELL, 2012).



**Figura 2.** Modelo esquemático da formação de fibrilas na parede celular de uma célula vegetal. Fonte: Adaptado de Yang et al. (2011).

Já a lignina é um polímero complexo formado especialmente por unidades de 4-hidroxifenilpropanóides derivados de três principais álcoois, a saber, molignóis p-cumaril, coniferil e sinapil, bem como por suas formas acetiladas mais recentemente descritas (RALPH et al., 2004, LIU, 2012). Na biomassa lignocelulósica também estão presentes, em menores concentrações, outras substâncias como proteínas, óleos, ácidos graxos, terpenos, ésteres e substâncias inorgânicas (LANGE, 2007).

### 3.2 Resíduos Agroindustriais

Com o aumento da expansão das atividades agroindustriais, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos têm sido gerados anualmente no mundo todo (SÁNCHEZ, 2009). A disposição destes resíduos causa sérios problemas ambientais. Em adição, culmina na perda de substâncias de valor agregado (MUSSATO; TEIXEIRA, 2010). Estes materiais potencialmente valiosos foram tratados apenas como resíduos por muitos países no passado e atualmente por alguns países em desenvolvimento, sendo dispostos muitas vezes no ambiente sem o devido tratamento (PALACIOS-ORUETA et al., 2005; DASHTBAN et al.,

2009). Desta forma, os resíduos industriais e agrícolas constituem uma das principais fontes de poluição ambiental. Segundo Sharada et al. (2013), o aproveitamento destes materiais em processos de reutilização pode contribuir para minimizar a contaminação pela disposição inadequada destes materiais.

A biomassa lignocelulósica como os resíduos agrícolas, os florestais, os de papel e os industriais, pode ser utilizada como fonte alternativa para a produção de etanol, em substituição às matérias-primas convencionais (KOJIMA et al., 2013). Na Tabela 1, a composição de alguns materiais lignocelulósicos com potencial uso para geração de energia está demonstrada.

**Tabela 1.** Composição de alguns tipos de biomassa lignocelulósica em %.

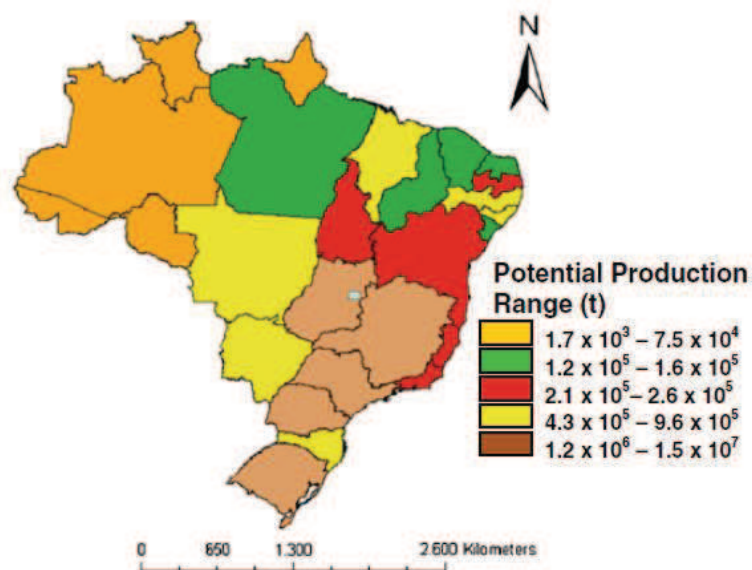
<b>Matéria-prima</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Celulose</b>	<b>Lignina</b>	<b>Outros</b>
Resíduos agrícolas	25-50	37-50	5-15	12-16
Madeira de lei	25-40	45-47	20-25	0,80
Madeira de conífera	25-29	40-45	30-60	0,50
Resíduos de indústria de papel e celulose	12-20	50-70	6-10	-
Jornal	25-40	40-55	18-30	-
Gramíneas	30-35	40-45	12	-
Bagaço de cana-de-açúcar	25	42	20	-
Espiga de milho	35	45	15	-
Palha de milho	26	38	19	-
Palha de arroz	24	32,1	18	-
Palha de trigo	26-32	29-35	16-21	-
Resíduos de Banana	14,80	13,20	14	-
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40	-
Sorgo	27	45	21	-

Fonte: Adaptado de Limayem; Ricke (2012); Iqbal et al. (2013).

Outra vantagem da utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção de açúcares fermentáveis é evitar a competição com os alimentos, pois a produção de etanol a partir de produtos alimentícios como cana-de-açúcar, milho e outras culturas é uma grande preocupação atual (BHATIA et al., 2012). No entanto, a produção de biocombustíveis não é a única alternativa de uso da biomassa lignocelulósica. Esta também pode ser utilizada para produção de diversas enzimas lignocelulolíticas; químicos como glicose, xilose, manose, galactose, ácido acético; compostos fenólicos; na indústria de papel e celulose; ração animal, entre outros (IQBAL et al., 2013).

O Brasil apresenta grande potencial para ser considerado o maior produtor de produtos biotecnológicos, devido a suas características ambientais e à sua biodiversidade, uma

vez que gera grandes quantidades de biomassa residual derivada de sua enorme produção agrícola (CASTRO; CASTRO, 2012). Recentemente, Castro e Castro (2012) realizaram um estudo através de georeferenciamento para estimar o potencial brasileiro em relação à produção das principais enzimas de interesse industrial como amilases, lipases, xilanases e celulases, a partir de resíduos agroindustriais. Os resultados sugerem que a produção pode alcançar quantidades suficientes para suprir o mercado interno e até mesmo o mundial. A Figura 3 apresenta o potencial de produção de celulases levantado por meio deste estudo, sendo os estados de Amapá e São Paulo os estados que poderiam produzir a menor e a maior quantidade de preparações enzimáticas, respectivamente. Outros estados com potencial para a produção de celulases seriam Goiás, Minas Gerais, Paraná e Rio grande do Sul. Porém, a produção das celulases é incerta, visto que o setor de produção de biocombustíveis, o setor mais promissor para uso das celulases, ainda está em processo de aperfeiçoamento das tecnologias a serem utilizadas.



**Figura 3.** Mapa do Brasil apresentando o potencial para produção de celulases por resíduos agroindustriais. Fonte: Castro; Castro (2012).

Atualmente, muitas pesquisas veem sendo realizadas sobre a hidrólise enzimática de diversos materiais lignocelulósicos por celulases bacterianas e fúngicas, como resíduo de óleo de abóbora, pó de serra, resíduos de abacaxi, resíduos de laranja, bagaço de cana, farelo de arroz, palha do arroz, farelo de trigo, resíduos de vinagre, resíduos de mandioca, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, soja, algodão, sabugo de milho, grama verde, capim seco, palha de aveia, biomassa de dendê, casca de banana, resíduo da fabricação de malte,

resíduos de corte de vinho de uva, silagem de sorgo doce, casca de soja, resíduos da produção de chá, resíduos da produção de uva, grama, entre outros (SHARADA et al., 2013).

### 3.2.1 Resíduos de Maracujá

Além da produção de cereais e outros produtos agrícolas de grande importância para a exportação como café, açúcar, álcool, soja e tabaco, a produção de frutas é um grande setor do mercado brasileiro. O país é o terceiro produtor mundial com 41,2 milhões de toneladas de frutas produzidas em 2005. Atualmente, existe uma demanda crescente por suco e polpa especialmente de abacaxi, maracujá, manga e banana, os quais são responsáveis pela maioria das exportações neste setor (BRASIL, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, tendo produzido 923,035 toneladas em 2011, com uma área total de 61,631 ha. O estado da Bahia é o maior produtor com uma área de 29,885 ha, apresentando uma produção de 410,078 toneladas em 2011, seguido pelos estados de Ceará (180,692 toneladas) e Espírito Santo (52,703 toneladas). O estado do Paraná é o 11º produtor com uma produção de 15,640 toneladas (IBGE, 2011).

O maracujá ou maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims) nativo do Brasil é um fruto típico de regiões quentes. Desta forma, as maiores regiões produtoras de maracujá são as regiões norte e nordeste, as quais apresentam taxas elevadas de produtividade e uma grande demanda no mercado para consumo *in natura* e para o uso industrial, despertando, assim, o interesse dos produtores (MADUREIRA et al., 2012). O maior consumo de maracujá é pelas indústrias alimentícias para processamento do fruto para fabricação de sucos, sendo geradas nesse processo em torno de 65-70 % de coprodutos (casca, semente e bagaço) (REIS et al., 2000).

As cascas do maracujá são ricas em proteínas, pectinas e fibras, apresentando assim potencial para diversas aplicações como alimentação animal (FERREIRA; PENA, 2010), como complementos na alimentação funcional humana (VERNAZA et al., 2009), e até mesmo como suplemento dietético, pois possui efeito hipoglicêmico (QUEIROZ et al., 2012). A composição centesimal da farinha da casca de maracujá seco a 60 °C está apresentada na Tabela 2.



**Tabela 2.** Composição centesimal da farinha da casca de maracujá.

<b>Determinações</b>	<b>g/100g de resíduo</b>
Umidade	5,9
Proteína	6,0
Resíduo Mineral Fixo	2,9
Gordura	2,1
Fibra alimentar total	62,0
Carboidratos	21,1

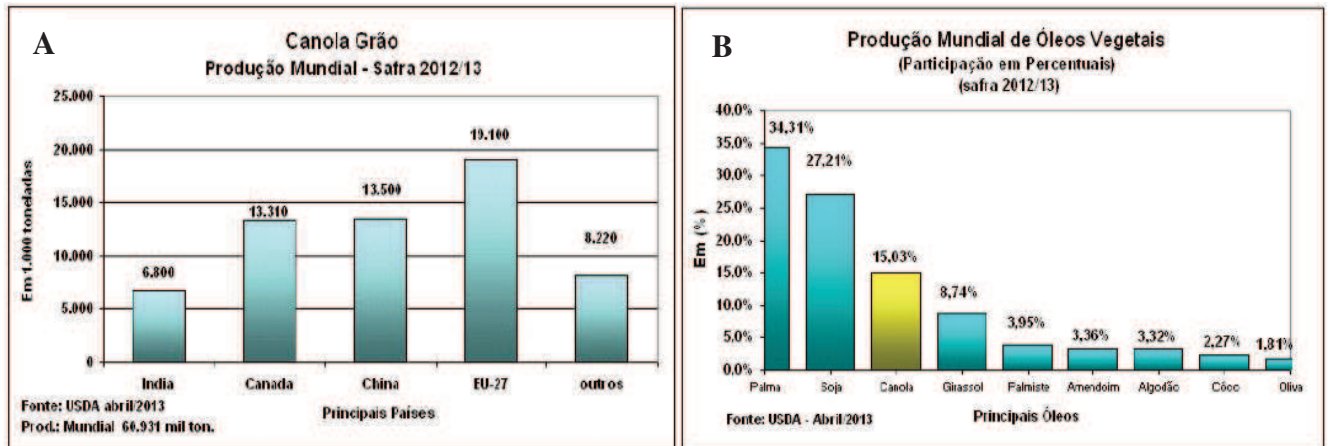
**Fonte:** Adaptado de Ferreira; Pena (2010).

Uma vez que a casca do maracujá apresenta uma rica composição e que esta é gerada em grandes quantidades, verifica-se que este subproduto apresenta potencial para ser empregado também no setor biotecnológico, como matéria-prima nos processos de sacarificação para a produção de biocombustíveis e como substratos para a produção de enzimas como celulases, pectinases e proteases.

### 3.2.2 Resíduos de Canola

A canola teve origem a partir de uma espécie de colza (*Brassica napus* e *Brassica campestris/rapa*). Esta foi modificada através de técnicas de melhoramento de plantas, a fim de diminuir abaixo de 2% os níveis de ácido erúxico, bem como diminuir os níveis de glicosinolatos para menos de 30 mmol/g de matéria seca da semente (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2009), uma vez que estas substâncias conferem toxicidade a colza (CONAB, 2009).

A canola foi desenvolvida no Canadá, sendo a palavra canola originada da expressão “CANadian Oil Low Acid” (azeite canadense de baixo teor ácido). Esta é uma planta oleaginosa, da família das crucíferas, sendo a terceira mais produzida no mundo, logo depois da soja e da palma. Os principais países produtores de canola são os Estados Unidos, seguido pela China, Canadá e Índia. Em 2011/2012 a produção mundial desta oleaginosa foi de 61 milhões de toneladas, sendo uma produção de 60,9 milhões de toneladas esperada para 2012/2013 (CONAB, 2013). A produção mundial do grão de canola (2012/2013), bem como a produção mundial de óleos vegetais (2012/2013) estão representadas na Figura 4.



**Figura 4.** Produção mundial de grão de canola, safra 2012/2013 (A). Produção mundial de óleos vegetais, safra 2012/2013 (B). Fonte: Adaptado de CONAB (2013).

No Brasil, a espécie cultivada é a *Brassica napus* L. variação oleífera, também conhecida como canola de primavera, a qual apresenta aproximadamente 24 a 27 % de proteína e 38 % de óleo. Neste país, a canola produzida é utilizada para produção de óleo para consumo humano, para a produção de biodiesel e de farelo da canola (34 a 38 % de proteínas), além de ser empregada para a formulação de rações (TOMM, 2007). Adicionalmente, pela qualidade nutricional tanto do óleo, quanto do farelo é indicada para dietas saudáveis e rações animais, respectivamente (TOMM; RAPOSO, 2008). Já na Europa, a canola é utilizada exclusivamente como matéria-prima para produção de biodiesel (BALAN et al, 2009).

Em 2012, a área colhida de canola no Brasil foi de 43,8 mil hectares, sendo 28,2 mil hectares (64,4%) localizados no Rio Grande do Sul; 12,9 mil hectares (29,5%) no Paraná; 2,3 mil hectares (5,2%) no Mato Grosso do Sul e 400 hectares (0,9%) em Santa Catarina. Outros estados também produziram canola em pequenas quantidades, como São Paulo com 630 ha, Minas Gerais com 600 ha, Mato Grosso com 25 ha e Goiás com 16 ha (MORI et al., 2013).

Segundo Tomm (2000), o Brasil possui grande potencial para ampliação da produção de canola, visto que a demanda tanto de grãos quanto de farelo de canola supera a oferta. Isto se deve ao fato de que óleos mais saudáveis podem ser obtidos a partir da canola, devido à sua rica composição. No entanto, os baixos rendimentos dessa cultura impedem sua expansão, além da falta de incentivos à pesquisa para gerar e melhorar as tecnologias de produção.

O farelo de canola é um subproduto da indústria de óleo, sendo gerado após a moagem das sementes para extração do óleo. Sua composição é variável, dependendo da espécie utilizada e das técnicas empregadas para a extração do óleo. Em geral, este é



constituído por 34 % de proteínas, 6 % de ácido fítico, 15 % de fibras e 26 % de carboidratos (NAIR; DUVNJAK, 1990). A composição do farelo de canola canadense está apresentada na Tabela 3.

Segundo Costa et al. (2010), o farelo de canola é utilizado principalmente em alimentação animal. No Paquistão, o farelo de canola é uma alternativa para alimentação de aves, devido ao alto preço do farelo de soja, sendo que eles importam canola para extração do óleo, e aproveitam o farelo para alimentação das aves, que apresentam bom rendimento, devido à boa qualidade nutricional (NASEEM et al., 2006). Já no Canadá, o principal uso do farelo de canola é na alimentação animal de aves, suínos e bovinos, sendo constituído por uma mistura de *Brassica napus*, *Brassica rapa* e *Brassica juncea* (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2009).

**Tabela 3.** Composição do farelo de canola canadense.

<b>Componente</b>	<b>Média</b>
Proteína bruta	36
Proteína não degradada no rúmen (%)	35
Óleo (%)	3,5
Ácido linoléico (%)	0,6
Cinzas	6,1
Açúcares (%)	7,8
Amido (%)	0,6
Sacarose (%)	6,2
Glicose frutose (%)	0,6
Celulose (%)	4,5
Oligossacarídeos (%)	2,2
Polissacarídeos não amiláceos (%)	15,7
Polissacarídeos não amiláceos solúveis (%)	1,4
Polissacarídeos não amiláceos insolúveis (%)	14,4
Fibra bruta (%)	12,0
Fibra em detergente ácido (%)	16,8
Lignina em detergente ácido (%)	5,1
Fibra em detergente neutro (%)	20,7
Fibra dietética total (%)	32,3
Taninos (%)	1,5
Sinapina (%)	1,0
Ácido fítico (%)	3,3
Glicosinolatos ( $\mu\text{mol/g}$ )	7,2

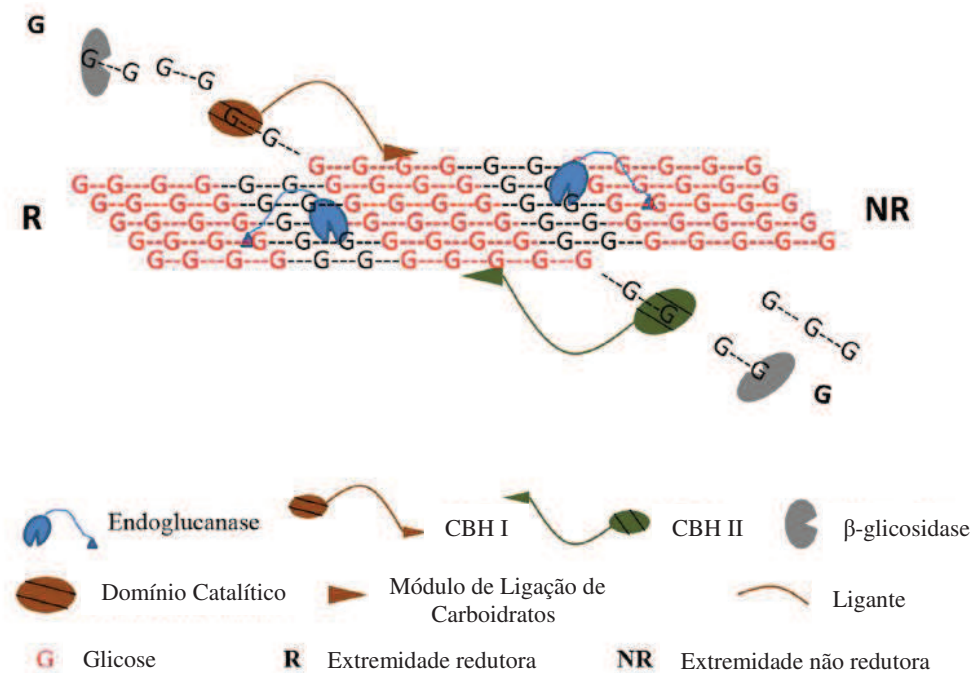
Fonte: Adaptado de Canadian International Grains Institute (2009).

Em relação à produção de enzimas, o farelo de canola já foi empregado para a produção de xilanases em meio líquido por *Trichoderma reesei*, alcançando-se uma produção de  $210 \text{ U mL}^{-1}$ . Os níveis de produção observados foram superiores aos obtidos por meio da

utilização do xilano e glicose (GATTINGER et al., 1990). Este resíduo também já foi empregado para produção de celulases por *Aspergillus ficuum* em cultivo sólido, observando-se uma produção máxima de 62,33 U/g (COSTA et al., 2010).

### 3.3 Enzimas Celulolíticas

As celulases fazem parte de um grupo de enzimas que apresentam a função de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celulose, a fim de liberar unidades de glicose e pequenas celodextrinas. As celobiohidrolases (CBH) ou exoglucanases, as endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EG) e as  $\beta$ -glicosidases (BG) constituem este grupo de enzimas (SWEENEY; XU, 2012). As endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da celulose, enquanto que as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) agem sobre as extremidades não redutoras formando celobiose. Os celo-oligossacarídeos e a celobiose originados pela ação das primeiras enzimas são posteriormente hidrolisados pelo terceiro grupo das celulases, as  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (CHAUVE et al., 2010; ZHANG et al., 2006). Desta maneira, a denominação  $\beta$ -glicosidase é conferida a diferentes tipos de enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas presentes em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados. Entretanto, sob certas condições, como baixa atividade de água ou alta concentração de substrato, estas enzimas podem catalisar a síntese de ligações  $\beta$ -glicosídicas entre diferentes moléculas (BHATIA et al., 2002). O mecanismo proposto para a hidrólise da celulose está representado na Figura 5 (ARANTES; SADDLER, 2010).



**Figura 5.** Figura esquemática da ação das diferentes celulases sobre a celulose. Fonte: Adaptado de Kumar; Murthy (2013).

Atualmente, as celulases são consideradas um dos principais grupos de enzimas industriais (SADHU; MAITI, 2013). Este complexo enzimático foi o terceiro grupo de enzimas mais comercializadas em 2009, logo após as amilases e proteases, sendo utilizadas nas indústrias de processamento de algodão, reciclagens de papel, detergentes e como aditivos de alimentação animal. Com perspectiva de grande crescimento, podem vir a se tornar o maior grupo de enzimas, especialmente quando forem utilizadas na produção em grande escala de biocombustíveis (WILSON, 2009).

Ainda, as celulases também têm sido intensivamente investigadas devido a sua ampla utilização na extração de óleos, pigmentos, essências, alcalóides e amido; produção de sucos; preparação de alimentos; produtos dermatológicos; adjuvantes para o malte da cerveja; indústrias de vinho; tratamento de lixo orgânico, além de seu potencial uso no setor energético anteriormente mencionado (KUBICEK et al., 1993; ZOPPAS et al., 2013).

As celulases comercializadas são vulneráveis a regulação do sistema, assim como são inibidas por vários produtos finais resultantes da ação catalítica do complexo enzimático. Assim, o desenvolvimento de enzimas mais eficientes e com características especiais é essencial para sua utilização nos processos de hidrólise, podendo ser atingido utilizando engenharia enzimática, misturas enzimáticas e bioprospecção de enzimas (MOHANRAM et al., 2013).

As enzimas lignocelulolíticas possuem um elevado custo, dificultando o seu uso em processos de conversão de biomassa. Por esta razão, o desenvolvimento de sistemas enzimáticos altamente eficientes é necessário. Recentes avanços neste contexto relacionam-se à aplicação de análises de genômica, proteômica e transcriptoma; na análise da composição nativa dos sistemas enzimáticos; na descoberta de novas enzimas e proteínas de ação sinérgica e também na compreensão dos mecanismos de regulação para a síntese destas enzimas. Assim, aliando-se a biologia de sistemas com as ferramentas da biologia sintética é possível desenvolver cepas fúngicas com altos índices de produção de enzimas. Visto que na última década diversas espécies tiveram seus genomas sequenciados, estudos ordenados de seus sistemas enzimáticos podem ser elaborados (LIU et al., 2013).

Desta forma, pesquisas relacionadas à identificação de novas enzimas e ao melhoramento dos processos são justificadas, uma vez o uso de enzimas microbianas é preferível à catalizadores químicos, por seu menor custo e por serem ambientalmente corretas (NIGAM, 2013), além de preservarem as estruturas originais dos carboidratos sob a forma de açúcares monoméricos (HORN et al., 2012).

### 3.4 Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea de múltiplas etapas, onde o polímero de celulose insolúvel é inicialmente quebrado na interface sólido-líquido pela ação de exoglucanases e endoglucanases. Posteriormente, reações da fase líquida ocorrem com os substratos solúveis (oligo e dissacarídeos), que são clivados pela ação das  $\beta$ -glicosidases à moléculas de glicose (YANG et al., 2011).

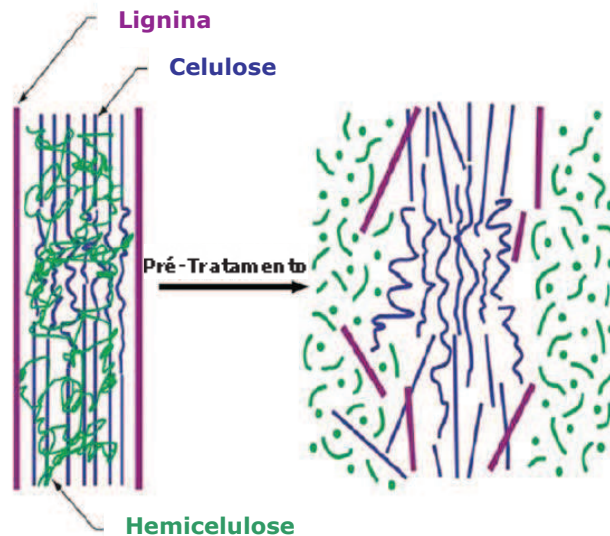
Desta maneira, a hidrólise enzimática tem como objetivo quebrar os polímeros de celulose em açúcares menores, como a glicose e outros oligômeros que poderão ser convertidos em produtos de interesse (YANG et al., 2011). Apesar de sua recalcitrância, a utilização da celulose nos processos de sacarificação enzimática é vantajosa, uma vez que este polímero apresenta homogeneidade estrutural. Apenas a glicose é liberada como produto final a partir de sua desconstrução (HORN et al., 2012).

A celulose pode ser hidrolisada também por processos químicos, utilizando, por exemplo, a hidrólise ácida. No entanto, este processo causa maior impacto ambiental, decorrentes dos resíduos gerados, danifica os equipamentos usados no processo, além de necessitar de alto investimento. Por estas razões, a hidrólise enzimática vem com o passar dos anos substituindo a hidrólise química (WEN et al., 2004). Embora a hidrólise enzimática

tenha se consolidado como o procedimento mais efetivo pelos rendimentos observados, por não gerar inibidores formados na hidrólise ácida e pelas vantagens ambientais (KRISHNA, 2000), sua viabilidade econômica está fortemente atrelada ao custo com as enzimas utilizadas no processo (FARINAS et al., 2008; SÁNCHEZ, 2009).

Uma vez que os processos de hidrólise são dificultados pela estrutura complexa da lignocelulose, os materiais a serem hidrolisados precisam ser submetidos a um pré-tratamento, independentemente do tipo de hidrólise empregada (YANG et al., 2011).

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é uma etapa crucial para a posterior hidrólise, pois é nessa etapa que a celulose tornar-se mais acessível ao ataque enzimático. Este processo aumenta a biodigestibilidade da biomassa, melhorando o rendimento de açúcares fermentáveis. Além disso, o pré-tratamento tem como objetivos: minimizar a geração de inibidores que possam interferir na fermentação, recuperar a lignina, aumentar a eficiência do processo utilizando quantidades inferiores de energia, bem como reatores menores (BHATIA et al., 2012). A Figura 6 apresenta um modelo esquemático da estrutura da lignocelulose após o pré-tratamento.



**Figura 6.** Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose antes e após o pré-tratamento. Fonte: Adaptado de Bhatia et al. (2012).

A estrutura da lignina define a eficiência do pré-tratamento, assim conhecer a estrutura deste polímero nas variadas espécies de plantas auxilia no desenvolvimento de métodos adequados para modificar ou remover a lignina presente na biomassa (DEL RÍO et al., 2012).

De acordo com Sun e Cheng (2002), entre os principais tipos de pré-tratamentos utilizados podem ser citados: I) Pré-tratamentos físico-químicos, tais como explosão de vapor (autohidrólise), explosão de fibra de amônia (AFEX) e explosão de CO<sub>2</sub>; II) Pré-tratamentos químicos, como ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo organosolvente; III) Pré-tratamentos biológicos, por meio da utilização de microrganismos para degradar a lignina.

Os diversos tipos de pré-tratamentos usados para degradar a hemicelulose formam principalmente pentoses e hexoses, compostos fenólicos, açúcares ácidos, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, aldeídos furanos e furfural. Uma pequena parte da lignina é degradada a compostos aromáticos. No entanto, a maior parte mantém-se como um resíduo sólido. A celulose é responsável pela maior parte dos açúcares gerados, seguida pela hemicelulose, a qual também gera uma parte expressiva dos açúcares totais. Desta forma, a glicose e a xilose são as principais substâncias geradas através da conversão da biomassa lignocelulósica (JOURDIER et al., 2013). Os monômeros de açúcares gerados são então fermentados por diversos microrganismos para formação dos produtos desejados (JÖNSSON et al., 2013). De acordo com diversos autores, compreender as mudanças que ocorrem na estrutura cristalina e regiões amorfas da celulose durante o pré-tratamento é essencial, devido à influência deste fator na eficiência do processo de hidrólise da celulose (CHAUVE et al., 2010; CHENG et al., 2011; YANG et al., 2011).

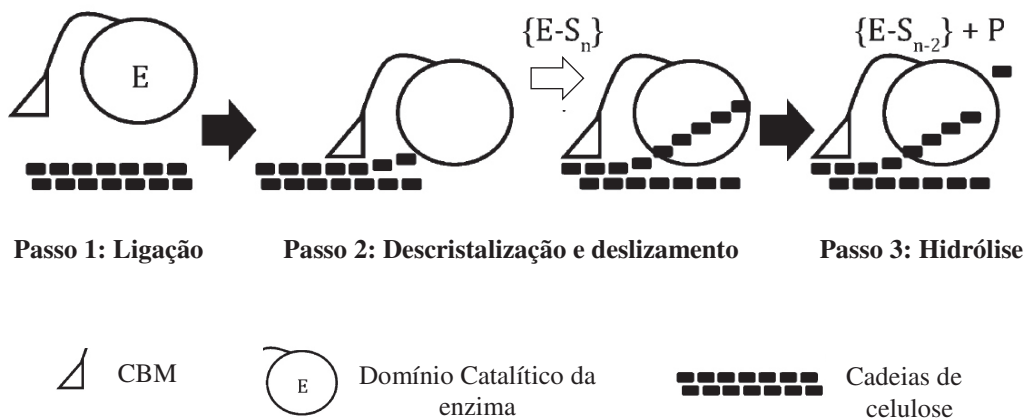
Uma alternativa para melhorar os processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é introduzir ferramentas da biologia sistêmica para o desenvolvimento de biocatalisadores, assim como os conhecimentos da genômica funcional, a fim de gerar sistemas microbianos com alta eficiência na conversão de açúcares fermentáveis e outros químicos de interesse industrial (ADSUL et al., 2011).

Atualmente, um dos grandes desafios da hidrólise da celulose é disponibilizar a maior parte da celulose que fica dentro do emaranhado de microfibrilas, fortemente empacotado e ordenado. Normalmente, a hidrólise se inicia apenas na superfície, sendo que as regiões internas ficam inacessíveis às enzimas (ARANTES; SADDLER, 2010).

As taxas de conversão na hidrólise enzimática dependem das propriedades estruturais da celulose e também das características das enzimas, sendo que até o momento não foi identificado nenhum fungo que possua todos os genes para codificar todos os tipos de enzimas celulolíticas necessárias para a hidrólise eficiente da celulose (KUMAR; MURTHY, 2013). Dentre as alternativas para aumentar as taxas de conversão na hidrólise enzimática, encontra-se a formulação de coquetéis enzimáticos, Neste processo, a eficiência hidrolítica

depende tanto das características individuais das enzimas, como também das concentrações ideais no coquetel multienzimático (GUSAKOV et al., 2007).

Porém, o processo de hidrólise enzimática parece ser muito mais complexo do que se poderia supor. O mesmo não está completamente elucidado, mas é provável que ocorra conforme apresentado na Figura 7. Primeiramente as celulases se ligam a celulose, através dos módulos de ligação de carboidratos (CBMs). Em seguida, ocorre o deslizamento da cadeia de celulose, dentro do sítio catalítico da enzima (exoglucanase), formando o complexo enzima-substrato. A partir deste ponto, celobioses e outros oligômeros são liberados como produtos da reação (GAO et al., 2013).



**Figura 7.** Modelo esquemático da hidrólise da celulose. Fonte: Adaptado de Gao et al. (2013).

A etapa inicial da hidrólise da celulose é chamada de amorfogênese (Figura 8). Nesta etapa, acredita-se que os CBMs desempenham um importante papel. Estes são adsorvidos na celulose em locais onde existem microfissuras, penetrando nos espaços interfibrilares. Esse processo gera modificações mecânicas na estrutura da celulose, pois estes módulos dentro das pequenas microfissuras geram uma pressão interna fazendo com que as moléculas de água entrem na estrutura da celulose, ficando estas entre as microfibrilas. Estas moléculas de água, por sua vez, vão penetrando cada vez mais interiormente, resultando na quebra de ligações de hidrogênio, tornando as microfibrilas acessíveis à ação das celulases. Desta forma, acredita-se que o principal papel do CBM é ancorar o módulo catalítico da celulase (ARANTES; SADDLER, 2010).

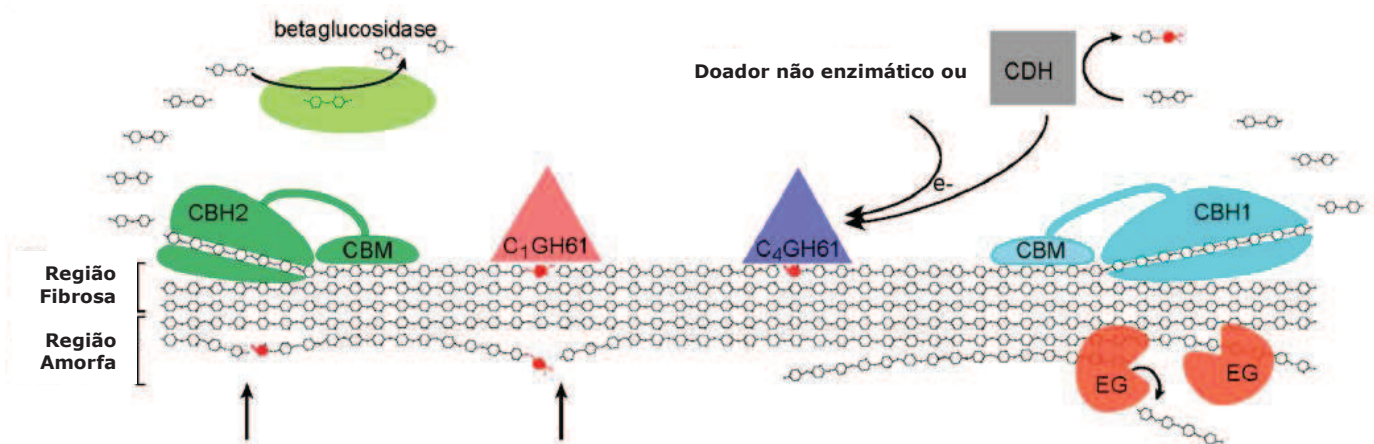






As expansinas são encontradas em plantas, onde possuem a função de afrouxar a rede de celulose durante o crescimento. As swoleninas são proteínas encontradas em fungos. Recentemente, uma nova swolenina foi identificada em *Penicillium oxalicum*, a qual promoveu a disruptura da celulose cristalina por um processo não hidrolítico (KANG et al., 2013. ). A swolenina de *Trichoderma reesei*, também foi capaz de promover a disruptura da celulose presente na palha de milho (GOURLAY et al., 2013).

Assim, estudos recentes sobre os processos de hidrólise sugerem um novo mecanismo de degradação enzimática da celulose (Figura 10), onde além das enzimas hidrolíticas clássicas (exoglucanases, endoglucases,  $\beta$ -glicosidasas), outros componentes como as proteínas que agem na amorfogênese e facilitam a ação enzimática são requeridos (HORN et al., 2012). Desta forma, os estudos sobre a eficiência da hidrólise enzimática não devem se restringir apenas as características estruturais e modo de ação das enzimas e a estrutura da celulose, mas também a essas proteínas acessórias com ação não hidrolítica, que promovem maior acessibilidade da celulose à ação enzimática.



**Figura 10.** Modelo esquemático atual do processo de degradação enzimática da celulose por fungos. Onde EG são as endoglucanase; CBH são as celobiohidrolase (exoglucanases); CDH são as celobioses desidrogenases; CBM são os módulos de ligação de carboidratos; CH61 proteínas com função de afrouxar as cadeias de celulose. Fonte: Adaptado de Horn et al. (2012).

### 3.5 Microrganismos Produtores de Celulases

Uma ampla variedade de microrganismos incluindo bactérias, fungos e actinomicetos estão envolvidos na decomposição da celulose na natureza. Os fungos têm sido geralmente considerados os principais organismos celulolíticos, sendo por esta razão os mais investigados

(KHALID et al., 2006). Estes são particularmente interessantes do ponto de vista industrial, por secretarem as enzimas diretamente no meio de cultivo, em grandes quantidades, facilitando sua recuperação, bem como sua purificação (POLIZELI et al., 2005). No entanto, as bactérias também possuem características interessantes para produção enzimática, com taxa de crescimento elevada, além de serem encontradas em uma grande variedade de ambientes, incluindo ambientes hostis, onde a produção de enzimas altamente resistentes às condições extremas de pH e temperatura é observada (SADHU; MAITI, 2013). Apesar de diversas bactérias produzirem enzimas capazes de degradar com eficiência materiais lignocelulósicos, a base genômica metabólica e as redes regulatórias (degradoma da celulose) ainda não são conhecidas. Segundo Xu et al. (2013), compreender essas características é essencial para o desenvolvimento de celulases eficientes para produção de combustíveis à base de celulose.

Os fungos estão entre os microrganismos com grande potencial para utilização em escala industrial, devido a sua enorme capacidade de produção de enzimas lignocelulíticas. Nos últimos anos, muitos métodos tem sido testados para aumentar a produção de enzimas fúngicas como técnicas recombinantes, mutagênese, co-cultura, engenharia metabólica, expressão heteróloga, imobilização de células e de enzimas, além da integração de processos (BHATIA et al., 2012).

Normalmente, os fungos produzem as três principais celulases, endoglucanases, exoglucanases, e  $\beta$ -glicosidases, em concentrações diferentes para cada uma delas. Dentre estes, os do gênero *Trichoderma* são amplamente conhecidos pela produção de enzimas de aplicações industriais, incluindo as celulases. Uma das espécies produtoras de celulases mais estudada é o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (PETERSON; NEVALAINEN, 2012), o qual apresenta o sistema celulotítico mais bem caracterizado (TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013). Algumas espécies do gênero *Penicillium* também produzem quantidades significativas de celulases como *P. iriense*, *P. citriviride*, assim como *P. funiculosum*, o qual é capaz de degradar as fibras de algodão (SHARADA et al., 2013). No entanto, a preparação de  $\beta$ -glicosidases mais comumente comercializada é produzida por uma linhagem de *Aspergillus niger* (Novozymes SP188) (CHAUVE et al., 2010).

Apesar dos excelentes níveis de produção de endo e exo glucanases exibidos pelos fungos do gênero *Trichoderma*, estes geralmente produzem baixas quantidades de  $\beta$ -glicosidases, as enzimas essenciais para a conversão eficiente da celulose em glicose (TIWARI et al., 2013). Assim como *T. reesei*, outras espécies de fungos filamentosos também possuem o mesmo padrão de produção de celulases, produzindo  $\beta$ -glicosidases em baixas

concentrações (QIAN, 2012; AGRAWAL et al., 2013). No entanto, esta característica pode ser melhorada por meio da mutagênese química (utilizando o etil metileno sulfonato) ou física (por radiação ultravioleta), como realizado por Agrawal et al. (2013), os quais obtiveram um aumento de 1,2 vezes na produção de  $\beta$ -glicosidase por *Bacillus subtilis*. Outras técnicas que podem ser empregadas para aumentar os níveis de  $\beta$ -glicosidases incluem a mutagênese sítio-dirigida, a expressão heteróloga, técnicas de engenharia genética para superexpressar estas enzimas, bem como a otimização dos processos de produção (TIWARI et al., 2013).

Contrariamente a estes fungos filamentosos, outras espécies fúngicas e de bactérias são capazes de produzir altos índices de  $\beta$ -glicosidases (QIAN et al., 2012). Nas espécies do gênero *Aspergillus* ocorre o processo inverso ao verificado em espécies de *Trichoderma*, onde baixos níveis de endoglucanases e exoglucanases são produzidos, enquanto que a produção de níveis mais elevados de  $\beta$ -glicosidases é observada (MOHANRAM et al., 2013). Como exemplo pode ser citado o fungo *Aspergillus niger* conhecido por produzir altos níveis de  $\beta$ -glicosidases com potencial para diversas aplicações industriais (AHMED et al., 2013; LIMA, et al., 2013).

### 3.6 As $\beta$ -glicosidases e suas Aplicações

As  $\beta$ -glicosidases são amplamente distribuídas, ocorrendo em todos os reinos dos seres vivos, de bactérias a mamíferos, onde desempenham diversas funções nos processos biológicos nestes organismos (BHATIA et al., 2002; HARNPICHARNCHAI et al., 2009). Como mencionado anteriormente, as  $\beta$ -glicosidases são responsáveis por catalisar as reações de hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas, liberando moléculas de D-glicose de terminais não redutores de celobiose e de pequenos oligossacarídeos (BHOITE et al., 2013; CHAUVE et al., 2010). A catálise desta reação é importante em muitos processos biológicos, como a degradação de polissacáridos estruturais e de armazenamento, a sinalização celular, oncogênese, interações hospedeiro-patógenos, assim como em diversas aplicações biotecnológicas (BHATIA et al., 2002).

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com a especificidade pelo substrato, onde as aril  $\beta$ -glicosidases hidrolisam exclusivamente aril  $\beta$ -D-glicosídeos, as celobiasas hidrolisam celoligosacarídeos, e as  $\beta$ -glicosidases com ampla especificidade hidrolisam ambos aril  $\beta$ -D-glucosídeos e celoligosacarídeos (PARRY et al., 2001). Estas enzimas pertencem às famílias 1 e 3 das glicosil hidrolases (TIWARI et al., 2013).

No processo de hidrólise de celulose, a celobiose se acumula no meio, inibindo as endoglucanases e exoglucanases por *feedback*, comprometendo, desta forma, o processo de hidrólise. Normalmente, essa inibição não ocorre, devido à ação das  $\beta$ -glicosidases, as quais por sua ação removem os compostos inibitórios das outras enzimas celulolíticas. Entretanto, altas concentrações de glicose inibem a ação das  $\beta$ -glicosidases, uma vez que o produto da reação inibe a atividade enzimática num mecanismo controlador. Portanto, o grande desafio é encontrar  $\beta$ -glicosidases com características especiais e produzidas em quantidades suficientes, especialmente enzimas tolerantes a altas concentrações de glicose, que possam ser empregadas nos processo de degradação de celulose, apresentando alta eficiência (SINGHANIA et al., 2013).

Atualmente, estas enzimas vêm ganhando grande atenção pelo setor econômico, devido ao amplo espectro de aplicações biotecnológicas como na produção de biocombustíveis, liberação de compostos aromáticos, hidrólise de glicosídeos de isoflavona, etc. (SINGHANIA et al., 2013). Em relação à liberação de compostos aromáticos ativos, um aumento na concentração de terpenos voláteis e norisoprenóides foi observado quando as  $\beta$ -glicosidases foram empregadas após o término do processo de fermentação (CODRESI et al., 2012).

Recentemente, a mais ampla aplicação das  $\beta$ -glicosidases é na sacarificação de biomassa para produção de biocombustíveis, sendo que a sua ação é uma barreira na conversão da celobiose em glicose devido à baixa eficiência e ao alto custo destas enzimas (TIWARI et al., 2013; ZIMBARDI et al., 2013). Assim, as  $\beta$ -glicosidases são consideradas um obstáculo para a produção de bioetanol, uma vez que elas catalisam o último passo para produção de glicose. Além das reações de clivagem, as  $\beta$ -glicosidases podem realizar a síntese de ligações glicosídicas por hidrólise reversa ou transglicosilação. Devido a esta atividade, estas enzimas podem também ser utilizadas para síntese de oligossacarídeos e glicoconjugados (BHATIA et al., 2002).

### 3.7 O Gênero *Trichoderma* e a Espécie *Trichoderma viride*

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos que se reproduzem assexuadamente, são amplamente distribuídos em diversos habitats, como solo, plantas, vegetação em decomposição e em madeiras (GAJERA et al., 2013; MISHRA et al., 2011), possuindo atualmente 117 espécies descritas (PANDYA et al., 2011).

Muitas espécies de *Trichoderma* possuem grande importância econômica pela capacidade na produção de enzimas e de antibióticos. Além disso, são empregadas como agentes de controle de pragas, pois produzem diversas enzimas com função de degradação da parede celular, tolerância ao estresse biótico e abiótico, crescimento de hifas e atividade antagonica contra patógenos de plantas (KINDERMANN et al., 1998; SHARMA et al., 2011). Estes fungos destacam-se por produzir ricas misturas enzimáticas antifúngicas, como quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases, as quais agem sinergicamente com outras enzimas e metabólitos, desempenhando papel importante nos processos de controle biológico. De acordo com Gajera et al. (2013), assim como as enzimas são importantes para o controle biológico, os genes que as codificam também podem ser úteis para a produção de plantas transgênicas resistentes a doenças.

No Brasil, fungos deste gênero são utilizados no controle biológico, sendo o primeiro relato de *Trichoderma* como um agente de controle, realizada em 1950 por Foster, onde a inativação do mosaico do tabaco foi verificada. Porém somente em 1987, um produto a base de *T. viride* foi comercializado contra a podridão da raiz e colo em macieira causada por *Phytophthora cactorum*. Este fungo foi previamente selecionado por sua capacidade em crescer no solo e proteger as mudas das plantas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A ação de biocontrole dos fungos *Trichoderma* tem sido descrita contra fitopatógenos como *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Botrytis cinerea* e *Fusarium* spp. Esse controle é realizado por meio de interações complexas entre o fungo, o patógeno e a planta. Os dois principais mecanismos de ação consistem na atividade direta do *Trichoderma* contra o patógeno por micoparasitismo e na resistência sistêmica induzida na planta. É provável que na interação micoparasítica, o hospedeiro envie sinais químicos que são reconhecidos pelo *Trichoderma*, desencadeando assim, a transcrição de genes relacionados ao micoparasitismo. Por meio de estudos das vias de sinalização, foi evidenciado que as proteínas G heterotriméricas e proteína quinase mitógeno-ativada (MAP) estão envolvidas no controle biológico, assim como a produção de enzimas hidrolíticas e de metabólitos, e a formação de estruturas de infecção. A transdução de sinais intracelulares provavelmente regula a expressão gênica do biocontrole (ZEILINGER; OMANN, 2007).

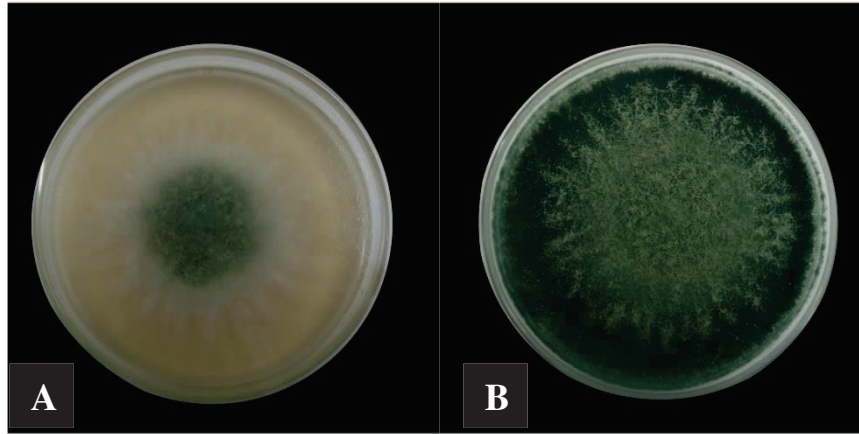
Além das aplicações já mencionadas, as espécies de *Trichoderma* são importantes também em aplicações industriais como fabricação de detergente, produção de tecidos, produção de ração animal, produção de combustível, branqueamento de papel, em tratamento de efluentes, e na degradação de pesticidas organoclorados (PANDYA et al., 2011).

O fungo filamentoso *T. viride* foi primeiramente descrito por Persoon (1794), tendo como sinônimo *Hypocrea rufa* (Pers.) (MYCOBANK, 2014). *T. viride* é referente à fase anamórfica e *Hypocrea rufa* à fase teleomórfica. Este fungo é uma das espécies fúngicas mais comumente relatadas em trabalhos científicos (JAKLITSCH et al., 2006).

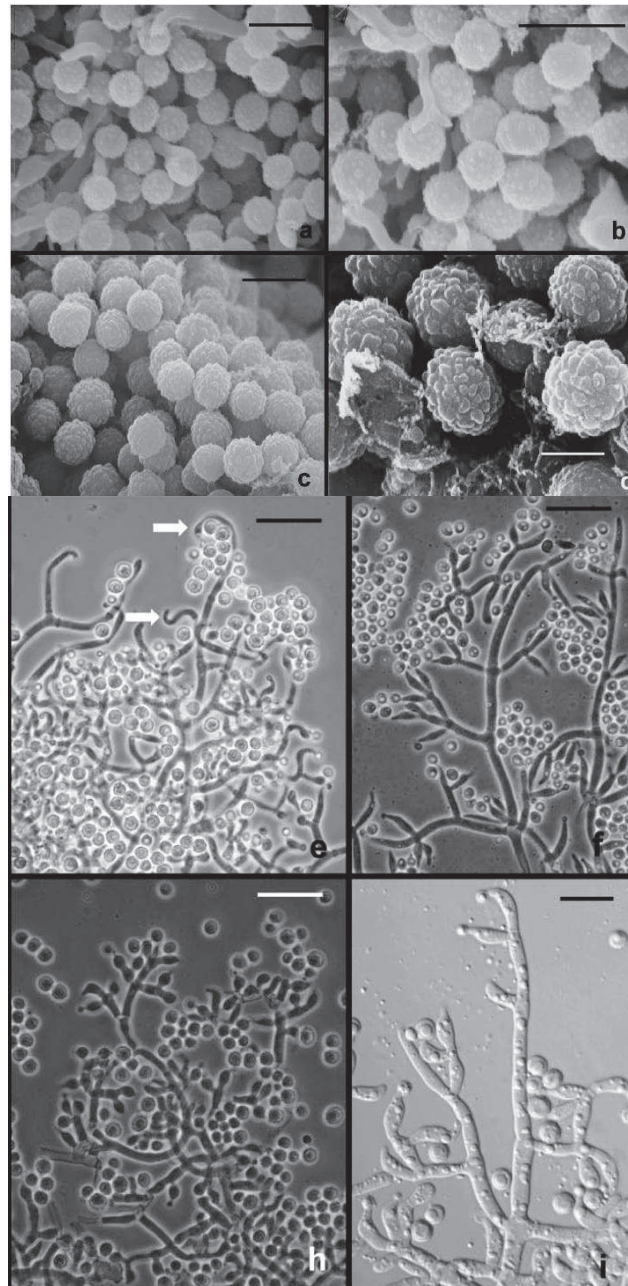
*Hypocrea rufa* foi descrita por Dingley (1957), apresentando as seguintes características: crescimento rápido, cor de azul esverdeado à amarelo esbranquiçado, principalmente em cultura com mais de 14 dias. Os conídios maduros se formam em sete dias, apresentando cor verde amarelada, ou de cinza a verde escuro em culturas mais velhas. O micélio apresenta-se geralmente com 4-7 µm de diâmetro, os conidióforos em forma única ou em grupo, com comprimento de 10-100 µm, ramificações abaixo dos septos, terminando em uma espiral de fiálides. As fiálides também formam ramos laterais de conidióforos, em forma de frasco com tamanho de 3-7 x 3-4 µm. Os conídios verrugosos, catenulados com fiálides, geralmente globosos, apresentam tamanho de 2,5-4,5 x 2,5-7 µm, pigmentados e equinulados. Os clamidósporos muitas vezes presentes, globosos, intercalares ou terminais, apresentam diâmetro de 7-12 µm. Ainda, apresentam temperatura ótima de 25 °C, raio da colônia de 11-33 mm, crescidos em meio PDA (Potato Dextrose Ágar), após incubação nesta temperatura por 48 horas (LIECKFELDT et al., 1999).

Cepas de *Trichoderma* apresentando conídios verrugosos são tradicionalmente identificados como *T. viride*. Porém, dois tipos morfológicamente distintos de verrugas conídias (I e II) foram encontrados. Cada tipo de conídio apresenta um padrão único de DNA mitocondrial. Através de dados moleculares, morfologia, fisiologia e características das colônias, foram distinguidas como espécies diferentes o tipo I e tipo II. Sendo o tipo I corresponde a *T. viride* "verdadeiro", com fase anamórfica chamado de *Hypocrea rufa*. E o tipo II representa uma nova espécie, chamada *T. asperellum*, que é próxima a *T. hamatum* (LIECKFELDT et al., 1999). A cultura cultivada em meio sólido de Vogel (1956), bem como os conídios e conidióforos de *T. viride*, estão apresentados na Figura 11 e 12, respectivamente.





**Figura 11.** Morfologia macroscópica de culturas de *T. viride*, em meio Vogel a 28 °C. A) após três dias de cultivo. B) após sete dias de cultivo.

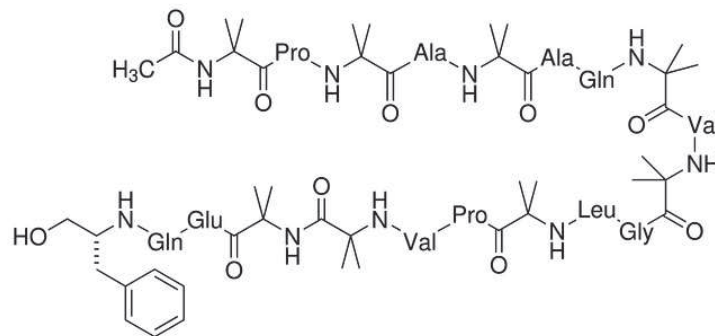


**Figura 12.** Micromorfologia de *T. viride*. Conídios: a, b, c, d. Conidióforos: e, f, h, i. Fonte: Jaklitsch et al. (2006).

*T. viride* é comumente utilizado como um agente de controle biológico, sendo efetivo no controle de pragas fúngicas causadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum capsici* em culturas de feijão verde (MISHRA et al., 2011). Na Índia *T. viride* é o biofungicida mais amplamente utilizado, existindo mais de 250 diferentes formulações comercializadas (MUKHERJEE et al., 2013).

Esta espécie fúngica também é capaz de produzir alguns antibióticos, como o peptídeo cátion monovalente ionóforo alameticina (Figura 13), já comercializado. A alameticina pode imitar o potencial de ação do neurônio através de membranas artificiais. Esta substância também tem sido utilizada para estudar interações de membrana de peptídeos antimicrobianos (SIGMA-ALDRICH, 2014a).

Além de antibióticos, a produção de proteases também foi observada por *T. viride* quando induzida por meio suplementado com extrato de leveduras, e proteínas purificadas como soroalbumina bovina, caseína e albumina. Certamente, a indução de proteases extracelulares de *T. viride* não é um processo apenas nutritivo, mas que inclui um processo de reconhecimento molecular ainda desconhecido, o que desencadeia uma resposta secretora específica (ŠIMKOVIČ et al., 2008).



**Figura 13.** Estrutura molecular da alameticina. Fonte: SIGMA-ALDRICH (2014a).

Adicionalmente, a produção de celulases por *T. viride* também tem sido relatada. Uma linhagem de *T. viride* foi capaz de produzir altas concentrações de enzimas do complexo celulolítico em meio sólido contendo resíduos de casca de laranja, obtendo-se a produção de 655 U/mL de endoglucanases, 412 U/mL de exoglucanases, e 515 U/mL de  $\beta$ -glicosidases (IRSHAD et al., 2013). Estas enzimas de *T. viride* também têm sido empregadas no processo de sacarificação da biomassa. Nos estudos de Zhao et al. (2013), celulases de *T. viride* foram



utilizadas na hidrólise do talo de milho, apresentando uma taxa de conversão em glicose correspondente a 81,2%.

### 3.8 O Gênero *Penicillium* e a Espécie *Penicillium verruculosum*

O gênero *Penicillium* inclui diversas espécies com habilidade para colonizar ampla variedade de ambientes naturais e antrópicos, pois se adaptam a condições extremas e conseguem utilizar uma grande diversidade de matéria orgânica para nutrição (NICOLETTI; STEFANO, 2012).

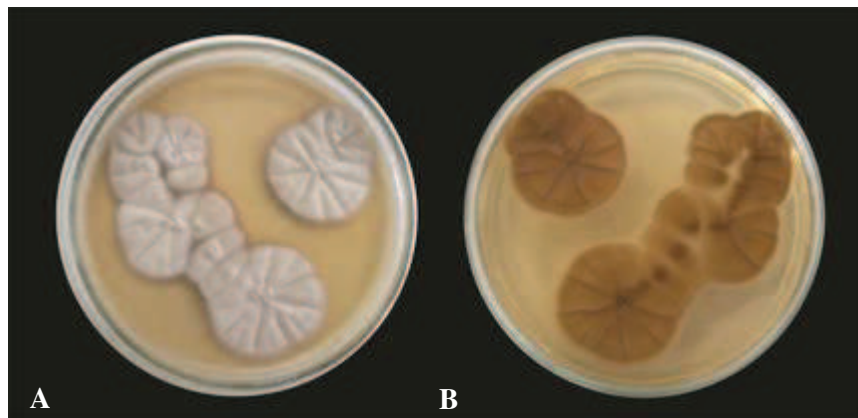
Os fungos deste gênero possuem grande importância nas áreas de meio ambiente, alimentícia e produção de drogas. Um exemplo é a penicilina, uma molécula utilizada como antibiótico sendo a substância mais conhecida produzida por este grupo (TIWARI et al., 2011). Também possuem importância no setor agrícola, pois possuem ação protetora em culturas de plantas, através da indução de resistência, produção de antibióticos e pelos processos de micoparasitismo (NICOLETTI; STEFANO, 2012). Metabólitos secundários de natureza alcalóide, dicetopiperazinas, quinolonas, quinazolinas, benzodiazepínicos e policetídeos, além de antibióticos, hormônios e micotoxinas são algumas das substâncias produzidas por espécies de *Penicillium* (KOZLOVSKII et al., 2013).

*P. verruculosum* foi descrito por Peyronel, em 1913, por meio da publicação “I germi atmosferici dei funghi con micélio (1913)” (MYCOBANK, 2014), onde exhibe as seguintes características morfológicas: colônias de aproximadamente 19-25 mm, em meio CYA, a 25 °C, durante sete dias de crescimento, com centro profundo, sulcado, flocoso, micélio branco a vermelho laranja, e marrom violeta; conidiogênese moderado a pesado, acinzentado a verde maçante; exsudato e pigmento solúvel ausente; reverter bege acastanhado ao marrom e laranja acinzentado.

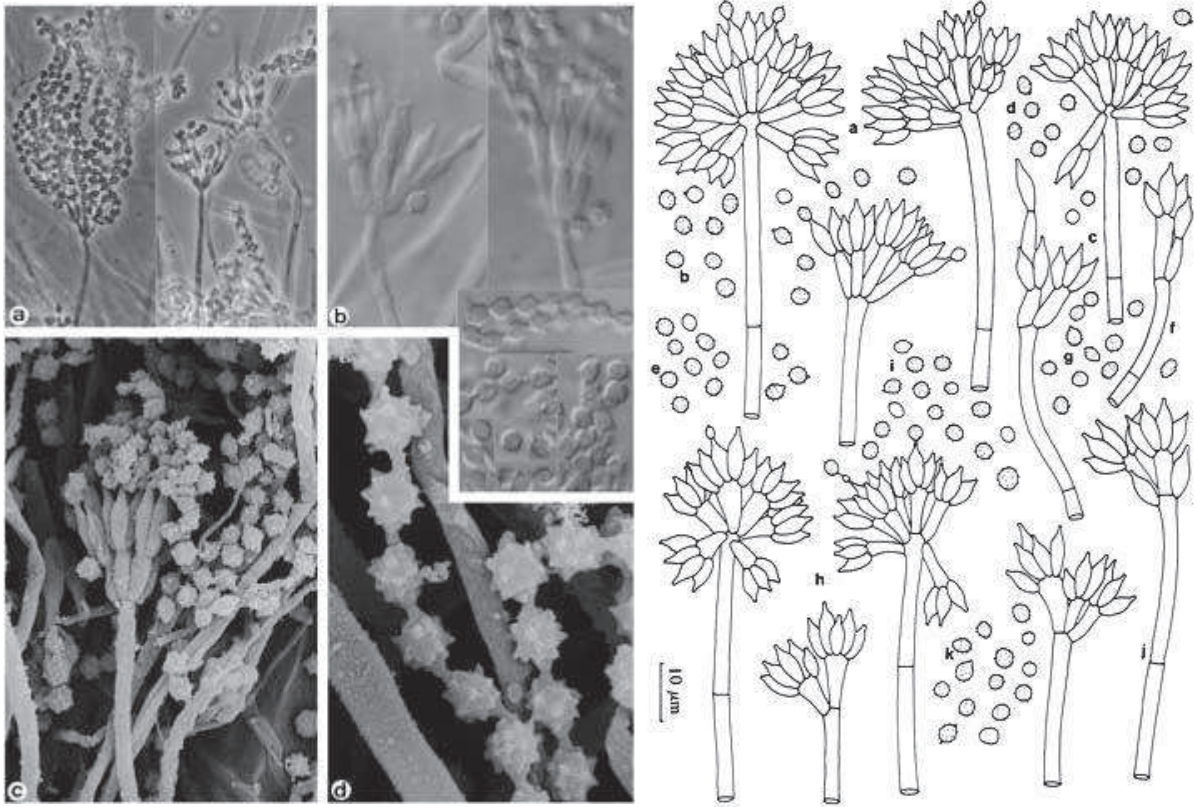
Em meio MEA, a 25 °C, com crescimento durante sete dias, o diâmetro das colônias apresenta 38-44 mm, plano, flocoso a funiculoso, margem irregular; micélio branco, amarelo acinzentado; conidiogênese moderada a abundante, acinzentada; exsudato e pigmento solúvel ausente; reverter cinza amarelado a amarelado maçante ou amarelo acinzentado. Em meio G25N, a 25 °C, por 7 dias: sem germinação ou ocasionalmente germinadas com um crescimento limitado.

Em meio CYA, a 37 °C, por sete dias apresenta diâmetro das colônias 24-26 mm, centro profundo, enrugado, subcentro e margem sulcado, flocoso, margem estreita; micélio branco, amarelo acinzentado; conidiogênese escassa; exsudato e pigmento solúvel ausente;

reverter marrom claro ao marrom. Conidióforos e conídios: conidióforos em MEA suportados principalmente a partir de micélio aéreo; estipes septadas,  $17-78 \times 2,0-3,6 \mu\text{m}$ , lisa, de paredes finas; penicilli biverticilados, menos frequentemente terverticilados, irregulares ou monoverticilados; rami suave, em grupos de 2-5,  $23,0-30,2 \times 2,8-3,2 \mu\text{m}$ ; métulas em verticilos de 2-5, lisas,  $10,3-14,2 \times 2,4-3,2 \mu\text{m}$ ; fiálides em verticilos de 4-7, ampuliformes ou um pouco acerosa, suave,  $10,3-13,2 \times 2,8-3,2 \mu\text{m}$ , conídios globosos a subglobosos,  $2,8-3,6 \mu\text{m}$ , verruculosos, com paredes espessas e irregulares. Neste mesmo meio, a  $5^\circ\text{C}$  por sete dias, a germinação não é verificada (BIORESOURCE COLLECTION AND RESEARCH CENTER, 2014). A cultura cultivada em meio ágar Sabouraud, bem como os conídios e conidióforos de *P. verruculosum*, estão apresentados na Figura 14 e 15, respectivamente.

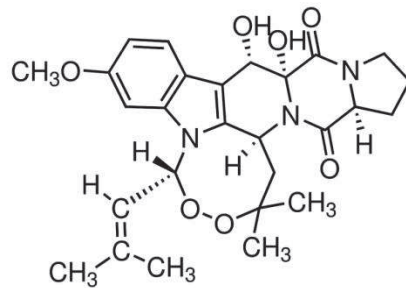


**Figura 14.** Morfologia macroscópica da cultura de *P. verruculosum*, em meio ágar Sabouraud, a  $28^\circ\text{C}$ , após sete dias de incubação. A) verso e B) anverso da colônia.

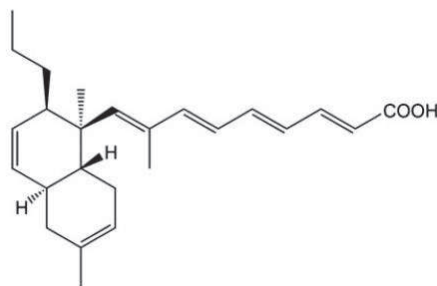


**Figura 15.** Micromorfologia de *P. verruculosum*. Figuras a, b, c, d: conídios. Figuras e, f, h, i: conidióforos. Fonte: MYCOBANK (2014).

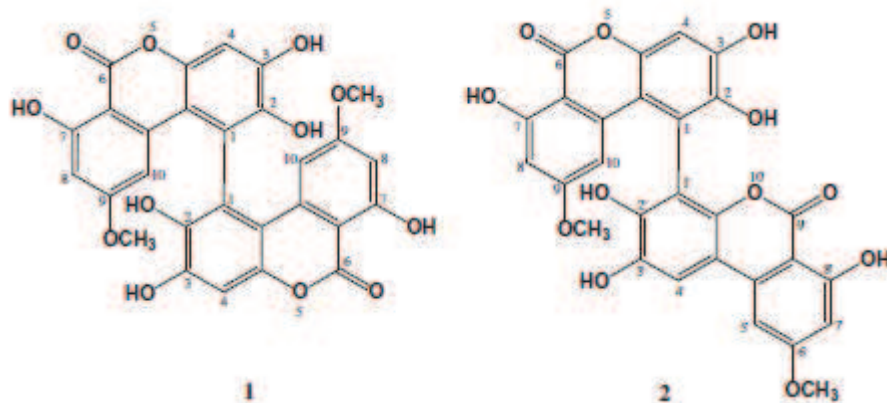
*P. verruculosum* produz uma toxina chamada de verrucologeno (Figura 16), isolada inicialmente por Cole et al. (1972). Esta micotoxina causa fortes tremores quando administrada oralmente em ratos e frangos, além de apresentar também potente atividade antibacteriana. A produção de outras substâncias químicas por *P. verruculosum* também tem sido reportada, como o ácido decalpenico (Figura 17). Este policetídeo fúngico com característica estrutural única, demonstrou induzir a expressão de marcadores iniciais de osteoblastos em células mesenquimais pluripotentes (SAKAMOTO et al., 2010). Adicionalmente, Kim et al. (2012) descreveu dois compostos diméricos da classe alternariol produzidos por *P. verruculosum* denominado de verrulactones A e B (Figura 18). Estas substâncias apresentaram ação antibiótica frente à cepas de *Staphylococcus aureus*, sendo possível o seu uso como agentes inibidores bacterianos.



**Figura 16.** Estrutura química do verrucologeno. Fonte: SIGMA-ALDRICH (2014b).



**Figura 17.** Estrutura química do ácido decalpenico. Fonte: Sakamoto et al. (2010).



**Figura 18.** Estrutura química de verrulactones A (1) e B (2). Fonte: Kim et al. (2012).

*P. verruculosum* também é capaz de produzir grandes quantidades de celulases, como demonstrado por Sinitsyn et al. (2009) em sua patente intitulada “*Penicillium verruculosum* filamentous fungus strain of a highly active complexo of cellulases and accessory enzymes and a method of production of biocatalyst for cellulose and hemicellulose hydrolysis”. Neste trabalho, *P. verruculosum* produziu consideráveis níveis de enzimas do complexo celulolítico como celobiohidrolases, endoglucanases, celobiasas e  $\beta$ -glicosidases, bem como enzimas xilanolíticas. Nos estudos conduzidos por Solov’eva et al. (2005), uma

linhagem de *P. verruculosum* foi capaz de produzir xilanases e celulases, sendo observada uma elevada produção de  $\beta$ -glicosidasases.

### 3.9 Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) teve origem em 1951 por BOX e WILSON (1951). A princípio visava responder problemas de determinação de condições ótimas em investigações químicas, porém estes autores acreditavam que essa metodologia pudesse ser utilizada em outras áreas, onde a experimentação fosse sequencial e o erro relativamente pequeno.

A MSR é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas, úteis para a modelagem e análise de problemas, onde a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é otimizar essa resposta (KOHLI; SINGH, 2011). A mesma, procura construir modelos empíricos capazes de encontrar relações estatísticas úteis entre todas as variáveis que fazem parte de um sistema industrial (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2008). A vantagem da MSR é diminuir o número de ensaios para realização de um experimento, reduzindo o tempo de experimentação, bem como os custos para o desenvolvimento das pesquisas.

Esta metodologia vem sendo amplamente utilizada como uma técnica de otimização, desenvolvimento e melhoria de processos, baseando-se na utilização de modelos fatoriais, onde a variável resposta é avaliada em todas as combinações possíveis dos fatores. O principal efeito de um fator é definido como a variação na resposta provocada por uma alteração no nível do fator considerado, quando os outros fatores permanecem constantes. Há uma interação (dependência) entre as variáveis, quando o efeito de um fator depende do comportamento do outro (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2008).

Adicionalmente, esta técnica se fundamenta em uma relação funcional entre uma resposta de interesse  $y$ , chamada também de variável dependente e um número de fatores associados, as variáveis independentes, que podem ser designadas por  $x_1, x_2, \dots, x_n$ . Essa relação é desconhecida, mas pode ser aproximada pelo seguinte modelo polinomial:

$$y = f'(x)\beta + \varepsilon \quad (\text{A})$$

Onde a resposta  $y$ ,  $f(x)$  é uma função vetorial de  $p$  elementos, representado por  $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)'$ ,  $\beta$  é um vetor de  $p$  coeficientes de constantes desconhecidas referido para os parâmetros, e  $\varepsilon$  é um erro experimental aleatório assumindo ter significância zero. O modelo

(Equação A) fornece uma representação adequada da resposta. Neste caso, a quantidade de  $f(x)$   $\beta$  representa a resposta média, isto é, o valor esperado de  $y$  (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

Na MSR, existem dois modelos utilizados, o modelo de primeira ordem (Equação B), sendo este apropriado para descrever um modelo de superfície plana e modelo de segundo ordem (Equação C), que inclui todos os termos do modelo de primeira ordem, além de todos os termos quadráticos. Quando existe uma curvatura na superfície de resposta, o modelo de primeira ordem não é adequado. Por esta razão, o modelo de segunda ordem deve ser utilizado.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{B})$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{C})$$

Os principais objetivos para se utilizar a Metodologia de Superfície de Resposta são: estabelecer um relacionamento entre a resposta e os fatores analisados, podendo desta forma prever os valores da resposta; determinar por meio de testes a importância dos fatores; e determinar as configurações ideais dos fatores que resultem no máximo (ou mínimo) a resposta de interesse (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

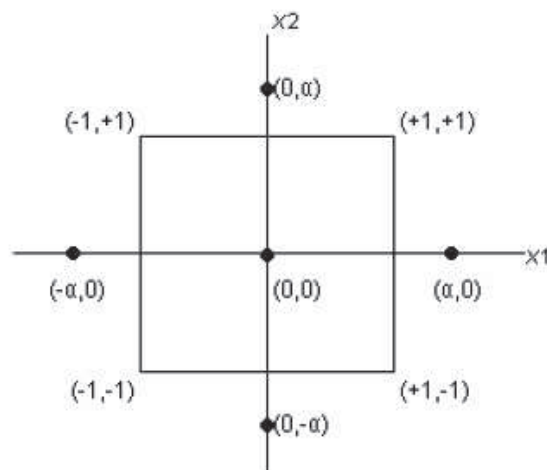
A relação entre um conjunto de variáveis independentes e a resposta ( $y$ ) é determinada por um modelo matemático chamado modelo de regressão. Quando existem apenas duas variáveis independentes, o modelo de regressão é chamado modelo de regressão linear simples. Quando existem mais do que duas variáveis independentes, o modelo é chamado de modelo de regressão linear múltipla (BRADLEY, 2007).

Existem diversos delineamentos para aplicação do modelo de segunda ordem, o mais conhecido deles é o Delineamento Central Composto (DCC) que consiste de pontos fatoriais (de um delineamento  $2^q$  e um delineamento  $2^{q-k}$  fatorial fracionário), pontos centrais e pontos axiais (BRADLEY, 2007).

Um modelo de primeira ordem que demonstra falta de adequação pode ser adicionado de pontos axiais aos termos quadráticos com mais pontos centrais para o desenvolvimento do DCC. O número de pontos centrais na origem e a distância de uma corrida axial do



delineamento central são dois parâmetros do DCC. As corridas centrais contêm informações sobre a curvatura da superfície. Se a curvatura é significativa, os pontos axiais adicionais permitem ao experimentador obter uma estimativa eficiente dos termos quadráticos (BRADLEY, 2007). A figura 19 traz a representação gráfica de um DCC com dois fatores.



**Figura 19.** Visualização gráfica de um planejamento composto central para  $q = 2$  fatores. Fonte: Bradley (2007).

Se a precisão da superfície de resposta estimada em algum ponto  $x$  depende apenas da distância de  $x$  para a origem, não da direção, o desenho é chamado de rotativo (OEHLERT, 2000). Quando o design rotativo gira em torno do centro, a variância da resposta  $y$  permanecerá igual. Uma vez que a razão para o uso de análise de superfície de resposta é a otimização localizada do desconhecido, faz sentido usar um delineamento giratório que fornece a mesma precisão da estimativa da superfície em todas as direções (BRADLEY, 2007).

O uso desta metodologia tem sido impulsionado pela necessidade do desenvolvimento de novos processos de fabricação e, conseqüentemente, por novos produtos, sendo esse fator decisivo em atividades industriais. De acordo com Montgomery (1999), os projetos experimentais estatísticos são ferramentas fundamentais para o sucesso da indústria (MONTGOMERY, 1999).

Atualmente, a MSR está sendo utilizada em diversas áreas da ciência, como biologia, medicina e economia (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2008). Pesquisas relacionadas à produção enzimática utilizam esta técnica, para elevar os níveis de enzimas produzidos. Em seus estudos, Zimbaridi et al. (2013) empregaram esta metodologia, para otimizar a produção de  $\beta$ -glicosidade,  $\beta$ -xilosidade e xilanase por *Colletrichum graminicola*, em fermentação em

estado sólido. A produção de exoglucanases por *Rhizopus stolonifer* utilizando a casca de café como substrato também foi avaliada por meio da MSR. Dentre os fatores analisados neste estudo podem ser citados o pH de cultivo, a umidade relativa e o tempo de fermentação (NAVYA et al., 2012). Ainda, os parâmetros ótimos relacionados à umidade inicial, temperatura de incubação e pH foram determinados nos estudos de Brijwani et al. (2010). Estes autores avaliaram a produção de celulases por uma co-cultura de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, durante a fermentação da casca de soja em estado sólido.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de $\beta$ -Glicosidasas Empregando-se Resíduos Agroindustriais como Substrato

A seleção dos melhores fungos produtores de  $\beta$ -glicosidase foi realizada com nove espécies fúngicas, sendo *Penicillium verruculosum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium glabrum* (linhagem 1), *Penicillium glabrum* (linhagem 2), *Penicillium miczinskii*, *Penicillium herquei* e *Fusarium sp.*, pertencentes à coleção do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, isolada a partir de solo de Mata Atlântica proveniente da Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, São Paulo. E duas espécies utilizadas foram isoladas de solo do município de Guarapuava, espécies ainda não identificadas, denominadas neste trabalho como espécie 01 (F1) e espécie 02 (D2).

Os resíduos utilizados para o cultivo dos fungos foram casca de maracujá, casca de café e farelo de canola. Estes resíduos foram obtidos localmente. Os resíduos foram preparados por lavagem exaustiva com água destilada, secagem a 80 ° C durante 24-48 h e posteriormente o material foi moído e peneirado.

Os conídios das nove linhagens fúngicas cultivadas em meio sólido de Vogel (1956), a 28 °C, por sete dias foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas, e suas concentrações ajustadas em Câmara de Neubauer para  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em frascos Elenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel (1956), suplementado a 1% (m/v) com as diferentes fontes de carbono (casca de maracujá, casca de café e farelo de canola).

Após o crescimento em meio líquido por nove dias, a uma temperatura de 28 °C, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de *Büchner*. Desta forma, foram obtidos os filtrados do meio de cultivo livre de células, os quais foram utilizados como fonte de enzimas. O micélio foi utilizado para determinação de proteínas intracelulares para mensurar o crescimento fúngico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A determinação da atividade  $\beta$ -glicosidásica foi realizada conforme descrição apresentada nos capítulos I e II.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de $\beta$ -Glicosidasas Empregando-se Resíduos Agroindustriais como Substrato

A produção de  $\beta$ -glicosidasas por diferentes fungos filamentosos utilizando a casca de maracujá, casca de café e o farelo de canola como substratos está apresentada na Tabela 4.

Verifica-se que os maiores níveis de  $\beta$ -glicosidase foram produzidos por *Penicillium verruculosum*, quando cultivado em casca de maracujá como fonte carbono, correspondendo a  $1,49 \text{ U mL}^{-1}$ . Quando crescido em farelo de canola, este mesmo fungo produziu  $1,07 \text{ U mL}^{-1}$ . A segunda maior produção de  $\beta$ -glicosidasas foi verificada quando *Penicillium myczinskii* foi cultivado em farelo de canola, obtendo-se uma produção de  $1,16 \text{ U mL}^{-1}$ . Porém, níveis baixos de atividade enzimática deste fungo foram observados quando a casca de maracujá foi utilizada como substrato ( $0,19 \text{ U mL}^{-1}$ ).

O fungo *Trichoderma viride* apresentou bons índices de atividade  $\beta$ -glicosidásica, tendo produzido  $0,92 \text{ U mL}^{-1}$  em casca de maracujá e  $0,37 \text{ U mL}^{-1}$  em farelo de canola.

**Tabela 4.** Produção de  $\beta$ -glicosidase por diferentes fungos cultivados em diferentes fontes de carbono.

Fungos	Casca de Maracujá			Casca de Café			Farelo de Canola		
	Proteína Intracelular ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Atividade Enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Atividade Específica ( $\text{U/mg proteína}$ )	Proteína Intracelular (mg)	Atividade Enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Atividade Específica ( $\text{U/mg proteína}$ )	Proteína Intracelular (mg)	Atividade Enzimática ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Atividade Específica ( $\text{U/mg proteína}$ )
<i>Penicillium verruculosum</i>	10,61 $\pm$ 0,24	1,49 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,08	7,13 $\pm$ 0,033	0,17 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,03	7,52 $\pm$ 0,36	1,07 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,05
<i>Trichoderma viride</i>	24,61 $\pm$ 0,26	0,92 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,02	8,30 $\pm$ 0,30	0,09 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,04	47,34 $\pm$ 1,51	0,37 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,06
<i>Penicillium glabrum</i> (1)	15,61 $\pm$ 0,72	0,59 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02	2,00 $\pm$ 0,09	0,09 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,02	4,47 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,03
<i>Penicillium glabrum</i> (2)	18,07 $\pm$ 0,36	0,21 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,04	7,82 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	9,54 $\pm$ 0,21	0,99 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,02
<i>Penicillium miczinskii</i>	1,36 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,04	1,55 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,04	6,49 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,03
<i>Penicillium herquei</i>	0,81 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	3,84 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,34 $\pm$ 0,14	0,36 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,14
<i>Fusarium sp.</i>	58,62 $\pm$ 0,32	0,04 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,03	8,45 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	47,60 $\pm$ 2,13	0,10 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01
Espécie 01 (F1)	12,52 $\pm$ 0,22	0,40 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	28,75 $\pm$ 0,44	0,47 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,03
Espécie 02 (D2)	18,29 $\pm$ 0,50	0,48 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,07	6,21 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,10	30,32 $\pm$ 0,36	0,83 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,01

A casca de café não induziu bons níveis de produção de  $\beta$ -glicosidases, assim como não foi observado crescimento expressivo (proteína intracelular) pelas linhagens avaliadas. No entanto, este substrato se mostrou propício para a produção de  $\beta$ -glicosidases por algumas espécies fúngicas como descrito por Navya e colaboradores (2012). Após o cultivo de *Rhizopus stolonifer* em fermentação em estado sólido, expressiva produção de  $\beta$ -glicosidase foi observada por estes autores ao empregar a casca de café como substrato, correspondendo a 452,88 U mL<sup>-1</sup>.

Diante da baixa atividade de  $\beta$ -glicosidases pelos fungos cultivados em casca de café e dos bons níveis de  $\beta$ -glicosidases produzidos por *P. verrucosum* e *T. viride* empregando-se os substratos casca de maracujá e farelo de canola, a avaliação das melhores condições de cultivo destes fungos para a produção de  $\beta$ -glicosidases foi realizada, sendo descrita nos capítulos I e II apresentados na sequência.

## CAPÍTULO I

### EMPREGO DA CASCA DE MARACUJÁ E DO FARELO DE CANOLA PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASES POR *Penicillium verruculosum*

#### Resumo

Resíduos agroindustriais são gerados em grandes quantidades e possuem um enorme potencial para utilização na geração de biocombustíveis e outros químicos de valor econômico. No entanto, o maior desafio é alcançar a hidrólise eficiente destes materiais, com o intuito de liberar açúcares fermentáveis ou outras substâncias de interesse industrial a custos competitivos com as tecnologias atuais. Dentre as enzimas utilizadas no processo de conversão da celulose, as  $\beta$ -glicosidases são as principais. Neste estudo, modelos matemáticos foram elaborados para a produção de  $\beta$ -glicosidase por uma linhagem de *Penicillium verruculosum* utilizando-se casca de maracujá e farelo de canola como substratos, assim como as melhores condições para a hidrólise da casca de maracujá foram estabelecidas, através da Metodologia de Superfície de Resposta. Adicionalmente, as  $\beta$ -glicosidases produzidas foram caracterizadas bioquimicamente. A produção de  $\beta$ -glicosidases em casca de maracujá, foi consideravelmente superior aos níveis obtidos com o emprego de farelo de canola, correspondendo a  $8,54 \text{ U mL}^{-1}$ . As  $\beta$ -glicosidases produzidas em casca de maracujá foram mais ativas a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , em pH 4,5, mostrando-se estáveis em uma ampla faixa de pH e nas temperaturas de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . A aplicação do extrato bruto de *P. verruculosum* foi eficiente em hidrolisar a casca de maracujá, obtendo-se rendimentos de  $6,40 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Desta forma, evidencia-se neste estudo o potencial de *P. verruculosum* em produzir  $\beta$ -glicosidases a baixo custo, assim como a possibilidade de aplicação destas enzimas para hidrolisar a casca de maracujá, a fim de disponibilizar açúcares fermentáveis para serem empregados em outros bioprocessos.

**Palavras-chave:** resíduos agroindustriais,  $\beta$ -glicosidases, hidrólise, *Penicillium verruculosum*.

## 1. Introdução

A celulose é a fonte de carbono mais abundante do planeta, sendo constituída por moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) (ADSUL et al., 2011), sendo um polímero altamente promissor para geração de energia renovável. No entanto, a hidrólise enzimática da celulose é considerada ainda um dos principais fatores limitantes da produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (CHAUVE et al., 2010).

As celulasas fazem parte do terceiro maior grupo de enzimas comercializadas mundialmente, principalmente pelo seu uso em indústrias de algodão, papel, detergentes, extração de sucos e aditivos em alimentação animal, no entanto, o mercado das celulasas poderá aumentar significativamente quando passarem a ser utilizadas amplamente para produção de combustíveis (WILSON, 2009). Estas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam em endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, as quais atuam de maneira sinérgica para converter celulose em glicose (LAN et al., 2013).

As  $\beta$ -glicosidases são consideradas enzimas imprescindíveis para conversão da celulose. Estas enzimas não apenas hidrolisam celo-oligosacarídeos e celobiose em glicose, o grande produto de interesse, como também eliminam o efeito inibitório da celobiose sobre endoglucanases e exoglucanases, aumentando a taxa de conversão de celulose em seus monômeros (RAMINI et al., 2012; SØRENSEN et al., 2013). Muitos microrganismos são capazes de sintetizar celulasas, porém, as  $\beta$ -glicosidases microbianas são geralmente produzidas em baixas concentrações (AGRAWAL et al., 2013). A produção desta enzima geralmente é realizada por fungos filamentosos, mas possui um elevado custo e baixa eficiência, sendo estas características o fator limitante para tornar o processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos eficaz e rentável industrialmente (YANG et al., 2011).

Nos últimos anos, o uso de resíduos agroindustriais em processos fermentativos tem sido intensamente investigado, a fim de reduzir os custos de produção enzimática (SINGHANIA et al., 2009). O emprego destes resíduos mostra-se interessante tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, por amenizar os problemas ambientais decorrentes da deposição destes resíduos no ambiente, bem como por serem matérias-primas de baixo custo (BHATIA et al., 2012). Uma vez que o processo produção de celulasas é uma das etapas essenciais e limitantes para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, justifica-se a realização

de estudos que promovam o desenvolvimento de celulases de forma mais efetiva e econômica.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi estabelecer as melhores condições de cultivo para a produção de  $\beta$ -glicosidase por uma linhagem de *Penicillium verruculosum*, empregando-se a casca de maracujá e o farelo de canola como substratos. Adicionalmente, as  $\beta$ -glicosidasas produzidas foram caracterizadas bioquimicamente e sua aplicação na hidrólise da casca de maracujá foi avaliada.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Microrganismo e Condições de Cultivo

A linhagem de *P. verruculosum* empregada neste estudo pertence à coleção do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, sendo inicialmente isolada a partir de solo de Mata Atlântica proveniente da Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, São Paulo – Brasil.

*P. verruculosum* foi cultivado em meio sólido de Vogel (1956), contendo 1,5 % de glicose e 1,5% ágar, a uma temperatura de 28 °C, durante sete dias para produção de esporos. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas em câmara de Neubauer para  $1,0 \times 10^7$  esporos mL<sup>-1</sup>. Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, suplementados com diferentes fontes de carbono e diferentes valores de pH, os valores de fonte de carbono e pH foram definidos de acordo com cada experimento do delineamento composto central rotacional descrito a seguir. Após o crescimento em meio líquido por períodos pré-estabelecidos nos planejamentos descritos posteriormente, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de *Büchner*. Desta forma, foram obtidos os filtrado do meio de cultivo livre de células, os quais foram utilizados como fonte de enzimas e de proteínas extracelulares e o micélio, o qual foi empregado para a determinação de proteínas intracelulares.

### 2.2 Determinação da Atividade Enzimática e Proteínas Totais

A determinação da atividade β-glicosidase foi realizada por meio da incubação de 0,2 mL de *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (PNPG) 5 mM em tampão McIlvane pH 5,0 e 0,3 ml do filtrado enzimático apropriadamente diluído em tampão McIlvane pH 5,0 a 50 °C. Após período de incubação apropriados, a reação foi paralisada pela adição de 2,0 ml de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de *p*-nitrofenol por ml, por minuto de reação, nas condições de ensaio.



As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford modificado (SEDMAK; GROSSBERG, 1977), utilizando como referência uma curva de calibração padrão de albumina de soro bovino (BSA).

### 2.3 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Com o intuito de elevar os níveis de  $\beta$ -glicosidase produzidos, as condições de cultivo foram testadas através do Delineamento Central Composto Rotacional e as respostas das atividades de  $\beta$ -glicosidade foram analisadas pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os experimentos foram realizados por  $2^3$  fatorial: concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH do meio de cultivo, com cinco níveis, gerando 17 combinações de tratamentos com três amostras no ponto central e seis pontos axiais. A corrida 18 foi utilizada como validação externa nos modelos quadráticos gerados. Dois planejamentos experimentais foram realizados: *P. verruculosum* cultivado em meio com casca de maracujá e com farelo de canola.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a seguinte equação polinomial de segunda ordem (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta prevista;  $\beta_0$  representa a interseção;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  são os coeficientes lineares,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  são os coeficientes quadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  são os coeficientes de interação e  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , são as variáveis independentes, concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente. O termo  $\varepsilon$  representa o erro experimental.

## 2.4 Caracterização Enzimática

### 2.4.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

Para determinar a temperatura ótima das  $\beta$ -glicosidades produzidas, a atividade enzimática foi avaliada em uma faixa de temperatura de 35 °C a 80 °C, em intervalos de 5 °C,

em tampão McIlvane pH 5,0. O pH ótimo da atividade enzimática foi avaliado em tampão McIlvane na faixa de pH de 3,0 a 6,5, em intervalos de 0,5 unidades, em temperatura ótima previamente estabelecida.

#### 2.4.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e pH

A estabilidade térmica foi determinada após incubação do extrato bruto em 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C em diferentes intervalos de tempo, em pH ótimo. A fim de avaliar a estabilidade enzimática frente ao pH, o extrato bruto diluído (1:2 v/v) em tampão McIlvane foi incubado em valores de pH de 3,0 a 8,0, a 4 °C. Após 24 horas, a atividade residual  $\beta$ -glicosidásica foi determinada.

#### 2.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

O efeito de alguns íons metálicos e outras substâncias sobre a atividade  $\beta$ -glicosidásica nas concentrações de 2 mM e 10 mM foi verificado. As reações enzimáticas foram conduzidas nas condições ótimas previamente estabelecidas.

#### 2.4.4 Determinação do $K_i$

Com o objetivo de verificar a tolerância das  $\beta$ -glicosidases ao produto final de reação, 0,2 mL do substrato PNPG 5 mM foram incubados juntamente com o extrato bruto e glicose em diversas concentrações (2 a 100 mM), de modo a completar um volume de 0,3 mL. Posteriormente, a atividade  $\beta$ -glicosidásica foi determinada nas condições ótimas de temperatura e pH previamente estabelecidas. O parâmetro cinético de inibição ( $K_i$ ) foi determinado, sendo este definido como a quantidade de glicose necessária para inibir 50% da atividade da  $\beta$ -glicosidase. Os dados foram analisados por regressão de Probitos, com limite de confiança de 1%.

Todos os ensaios de caracterização enzimática foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

## 2.5 Hidrólise Enzimática da Casca de Maracujá

Antes da hidrólise enzimática, o pré-tratamento alcalino foi realizado para aumentar o teor de celulose na casca de maracujá, através da eliminação parcial da fração de legnina, de acordo com Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006). Para isso, a casca de maracujá foi tratada com NaOH a 4 % e autoclavada a 121 °C durante 30 minutos. Em seguida, o substrato foi lavado com água destilada. O efeito alcalino foi ainda mais neutralizado com adição de ácido fosfórico diluído, em seguida a mistura foi seca a 70 °C.

A hidrólise enzimática da casca de maracujá, empregando-se o extrato bruto de *P. verruculosum* crescido em casca de maracujá, foi realizada de acordo com o método proposto por Ghose (1987). Para tal, 300 mg de casca de maracujá pré-tratada foram incubados em tampão McIlvane. Os frascos foram pré-incubados em água nas diferentes temperaturas de hidrólise testadas, durante 10 minutos para aclimatação, após o filtrado bruto de *P. verruculosum* foi adicionado para iniciar a hidrólise. Quantidades variáveis de tampão e filtrado bruto foram adicionados a um volume final de 5 mL, de acordo com o desenho experimental. Foram recolhidas amostras após períodos pré-estabelecidos, que foram imediatamente resfriadas em gelo e centrifugadas a 5.000 x g durante 10 minutos (YANG; WYMAN, 2004). As análises de glicose foram efetuadas sobre os sobrenadantes obtidos, empregando-se o kit de ensaio da glicose-oxidase.

A hidrólise foi realizada por Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), 2<sup>4</sup> fatorial: tempo, pH, temperatura e concentração da enzima, foram utilizados como as variáveis independentes (fatores), resultando em 27 combinações de tratamentos, sendo três amostras no ponto central. A corrida número 28 foi utilizada como validação externa para os modelos quadráticos gerados.

Para o sistema com quatro fatores, o modelo é dado pela seguinte equação polinomial de segunda ordem (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4 + \varepsilon \quad (2)$$

Onde Y é a resposta prevista;  $\beta_0$  representa a interseção;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$  são os coeficientes lineares,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{33}$  e  $\beta_{44}$  são os coeficientes quadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{14}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{24}$  e  $\beta_{34}$  são os coeficientes de interação e  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  e  $x_4$ , são as variáveis independentes de Tempo (T), pH,

Temperatura (Temp) e concentração da enzima (E), respectivamente. O termo  $\varepsilon$  representa o erro experimental.

Os valores codificados dos planejamentos de otimização e hidrólise foram calculados de acordo com a equação de regressão:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (3)$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado,  $X_i$  é o valor real,  $X_0$  é o valor real no ponto central e  $\Delta X_i$  é o valor de mudança de passo.

A análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta para os experimentos de otimização e hidrólise enzimática foram gerados pelo programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, USA).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) realizada através de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)  $2^3$  fatorial foi conduzida, com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para produção enzimática, bem como verificar as interações entre concentração do substrato, tempo e pH.

Para tal, *P. verruculosum* foi cultivado em presença de casca de maracujá e de farelo de canola, constituindo dois planejamentos experimentais. Os valores reais e codificados, bem como os resultados obtidos nos dois planejamentos experimentais estão apresentados na Tabela 1, onde os tratamentos de 1 a 17 fazem parte do delineamento experimental, enquanto a corrida 18 refere-se à validação externa dos modelos.

Até o presente momento, a produção de  $\beta$ -glicosidases e de outras hidrolases por fungos filamentosos utilizando estes resíduos agroindustriais não foi reportada na literatura. No entanto,  $\beta$ -glicosidases fúngicas tem sido produzidas empregando-se outros resíduos, tais como casca de café (NAVYA et al., 2012), cana-de-açúcar (ZIMBARDI et al., 2013), casca

de arroz (BHATTI, 2013), farelo de trigo (QIAN et al., 2012), palha de milho e farelo de trigo (GAO et al., 2012).

**Tabela 1.** Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de  $\beta$ -glicosidase por *P. verruculosum*.

Corridas	Valores reais (codificados)			$\beta$ -glicosidase (U mL <sup>-1</sup> )	
	Substrato (%)	Tempo (dias)	pH	Casca de Maracujá	Farelo de Canola
1	1,1 (-1)	4,4 (-1)	4,2 (-1)	0,57	0,62
2	2,9 (1)	4,4 (-1)	4,2 (-1)	0,98	1,35
3	1,1 (-1)	8,6 (1)	4,2 (-1)	2,78	3,84
4	2,9 (1)	8,6 (1)	4,2 (-1)	8,54	4,32
5	1,1 (-1)	4,4 (-1)	7,8 (1)	0,40	0,29
6	2,9 (1)	4,4 (-1)	7,8 (1)	1,14	0,50
7	1,1(-1)	8,6 (1)	7,8 (1)	1,16	0,70
8	2,9 (1)	8,6 (1)	7,8 (1)	2,27	1,32
9	0,5 (-1,68)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,58	1,00
10	3,5 (1,68)	6,5 (0)	6,0 (0)	6,33	2,26
11	2,0 (0)	3,0 (-1,68)	6,0 (0)	0,49	0,41
12	2,0 (0)	10,0 (1,68)	6,0 (0)	3,13	2,79
13	2,0 (0)	6,5 (0)	3,0 (-1,68)	2,29	2,13
14	2,0 (0)	6,5 (0)	9,0(1,68)	0,60	0,56
15	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	3,32	2,28
16	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	3,45	2,30
17	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	3,59	2,10
18*	2,5	5,5	5,5	3,52	2,64

\* Valores referentes à validação.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos gerados está resumida na Tabela 2. Os modelos da atividade  $\beta$ -glicosidásicas foram significativos ( $p < 0,05$ ). Considerando-se o teste  $F$ , os dois modelos foram preditivos, pois os valores de  $F$  calculado foram maiores do que os valores de  $F$  tabelado. Os coeficientes de determinação  $R^2$  de 0,9112 para *P. verruculosum* em casca de maracujá e 0,9579 para *P. verruculosum* em farelo de canola indicam que 91,12% e 95,79%, respectivamente, da variabilidade dos dados podem ser explicadas por estes modelos, valores considerados altos ao se considerar experimentos biológicos.

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para  $\beta$ -glicosidase produzida por *P. verruculosum* cultivado em casca de maracujá e farelo de canola, e os valores de  $R^2$  e  $F$ -valor.

$\beta$ -Glicosidase – Casca de Maracujá							$\beta$ -Glicosidase – Farelo de Canola					
Termos	SQ	MQ	gl	$F$	$F_{tab}$	$F/F_{tab}$	SQ	MQ	Gl	$F$	$F_{tab}$	$F/F_{tab}$
M	72,702	24,234	3	44,47	3,26	13,64	22,524	5,631	4	68,27	3,20	21,33
R	7,084	0,545	13	-	-	-	0,990	0,082	12	-	-	-
T	79,785	-	16	-	-	-	23,513	-	16	-	-	-
$R^2$	0,9112						0,9579					

Termos	Coefficientes	$p$ -valor	Coefficientes	$p$ -valor
Média/Interc.	<b>3,449 (<math>\pm 0,57</math>)</b>	<b>0,001</b>	<b>2,280 (<math>\pm 0,21</math>)</b>	<b>0,000</b>
[S]	<b>1,296 (<math>\pm 0,27</math>)</b>	<b>0,002</b>	<b>0,306 (<math>\pm 0,10</math>)</b>	<b>0,020</b>
[S] <sup>2</sup>	0,017 ( $\pm 0,30$ )	0,957	-0,201 ( $\pm 0,11$ )	0,116
T	<b>1,179 (<math>\pm 0,27</math>)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,838 (<math>\pm 0,10</math>)</b>	<b>0,000</b>
T <sup>2</sup>	-0,567 ( $\pm 0,30$ )	0,101	-0,213 ( $\pm 0,11$ )	0,099
pH	<b>-0,785 (<math>\pm 0,27</math>)</b>	<b>0,024</b>	<b>-0,730 (<math>\pm 0,10</math>)</b>	<b>0,000</b>
pH <sup>2</sup>	-0,696 ( $\pm 0,30$ )	0,054	<b>-0,303 (<math>\pm 0,11</math>)</b>	<b>0,031</b>
[S]xT	0,715 ( $\pm 0,35$ )	0,084	0,020 ( $\pm 0,13$ )	0,884
[S]xpH	-0,539 ( $\pm 0,35$ )	0,173	-0,049 ( $\pm 0,13$ )	0,724
TxpH	<b>-0,984 (<math>\pm 0,35</math>)</b>	<b>0,028</b>	<b>-0,620 (<math>\pm 0,13</math>)</b>	<b>0,002</b>

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade;  $F$ :  $F$  calculado;  $F_{tab}$ :  $F$  tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negritos são estatisticamente significativos.

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear múltipla e os modelos matemáticos que representam a atividade da  $\beta$ -glicosidase foram expressos pelas equações 4 e 5, levando-se em consideração somente os termos significativos:

$$\beta gli (Maracujá) = 3,449 + 1,296S + 1,179T - 0,785pH - 0,984 T pH \quad (4)$$

$$\beta gli (Canola) = 2,280 + 0,306S + 0,838T - 0,730pH - 0,303pH^2 - 0,619 T pH \quad (5)$$

Onde  $\beta gli$  é atividade de  $\beta$ -glicosidase, S é concentração do substrato, T é o tempo e pH é o potencial hidrogeniônico.

Os coeficientes de regressão também estão apresentados na Tabela 2. A análise do  $p$ -valor é um instrumento útil para avaliar a significância dos coeficientes, de maneira que quanto menor o  $p$ -valor, maior a significância do coeficiente de variação correspondente.

Observa-se que os termos lineares das variáveis independentes de concentração do substrato [S], tempo (T) e pH foram significativos para a produção de  $\beta$ -glicosidase em casca de maracujá e farelo de canola, enquanto que para os termos quadráticos, somente o pH foi

significativo em farelo de canola, exercendo este último maior influência sobre os níveis enzimáticos produzidos. Em relação às interações entre os termos, apenas a interação entre tempo (T) e pH foram significativas para os dois substratos. Esta análise é importante para compreender como o processo biológico em questão funciona ao nível de sistema e como um fator individual interage de modo dinâmico com outro (FALLER et al., 2003). Isto indica que os termos significativos agem como fatores limitantes para produção de  $\beta$ -glicosidase por *P. verruculosum*.

Pode-se concluir que *P. verruculosum* quando cultivado em presença de casca de maracujá, a variável mais importante é a concentração do substrato [S] linear, seguida pelo tempo de cultivo (T) linear, pH linear e por fim a interação entre tempo e pH. Entretanto, quando cultivado em farelo de canola, a variável mais importante é o tempo de cultivo (T) linear, seguido pelo pH linear, a interação entre tempo e pH, a concentração do substrato [S] linear, e por fim o pH quadrático. Adicionalmente, em relação aos dois substratos, quando a concentração do substrato e o tempo de cultivo são aumentados e o valor de pH é diminuído, a produção de  $\beta$ -glicosidases é favorecida. As curvas de superfície de resposta para os fatores mais importantes que afetam a produção de  $\beta$ -glicosidase estão apresentados na Figura 1.

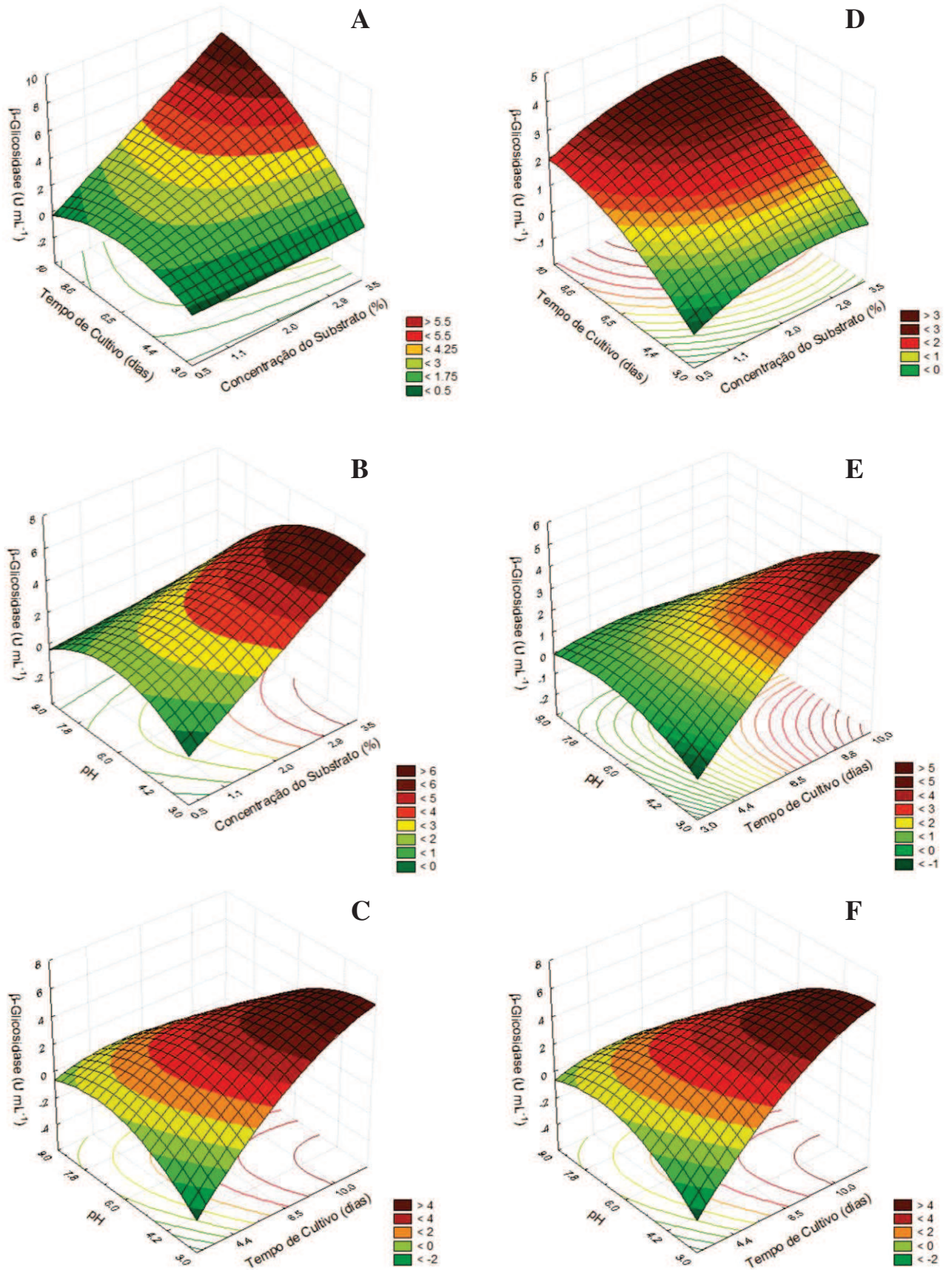
Verifica-se que com a utilização da casca de maracujá, a produção de  $\beta$ -glicosidases foi consideravelmente superior aos níveis obtidos com o emprego de farelo de canola. Em relação ao crescimento micelial o mesmo padrão foi observado, onde o fungo em casca de maracujá cresceu 30,97% a mais, correspondendo a 67,80 mg mL<sup>-1</sup> de proteína em relação ao farelo de canola, onde 46,88 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas foram obtidos (dados não mostrados). De acordo com Ferreira e Pena (2010) a farinha de casca de maracujá possui 62% de fibras, enquanto que o farelo de canola possui 12% de fibras, sendo 4,5% de celulose (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2009). Desta forma, as diferentes composições, bem como à acessibilidade aos diferentes substratos pelo fungo podem explicar os diferentes níveis de  $\beta$  glicosidase observados (KNOB et al., 2013).

Os níveis de produção de  $\beta$ -glicosidases obtidos neste trabalho (8,54 U mL<sup>-1</sup>) empregando-se a casca de maracujá como substrato foram superiores aos obtidos quando *Aspergillus awamori* foi cultivado em meio contendo farelo de trigo, correspondendo a 0,01047 U mL<sup>-1</sup> (GOTTSCHALK et al., 2013) e quando *Penicillium miczynskii* foi cultivado em casca de abacaxi, onde uma produção de 1,99 U mL<sup>-1</sup> foi verificada (BEITEL; KNOB, 2013). Desta forma, o emprego da casca de maracujá para a produção de  $\beta$ -glicosidases por *P. verruculosum* mostra-se eficaz, uma vez que pode reduzir a deposição deste resíduo no meio ambiente, bem como proporcionar uma diminuição nos custos de produção destas enzimas.



Segundo Liu (2013), um dos principais fatores limitantes da utilização de enzimas lignocelulolíticas em processos industriais é o seu elevado custo, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas eficientes de produção.

As condições de cultivo que apresentaram maior produção de  $\beta$ -glicosidase por *P. verruculosum* cultivado em casca de maracujá ( $8,54 \text{ U mL}^{-1}$ ) e farelo de canola ( $4,32 \text{ U mL}^{-1}$ ) foram concentração do substrato 2,9 %, pH 4,2 e tempo de incubação de 8,6 dias (corrida 4). Condições diferentes foram estabelecidas para *Penicillium funiculosum* que atingiu a máxima produção de  $\beta$ -glicosidases ( $3,1 \text{ U mL}^{-1}$ ) em pH 5,0, por 4 dias (RAMANI et al., 2012) e por *P. miczynskii*, o qual atingiu máxima produção ( $2,82 \text{ U mL}^{-1}$ ) quando crescido em pH 5,5, por 9 dias (BEITEL; KNOB, 2013).



**Figura 1.** Superfície de resposta para a produção de  $\beta$ -glucosidase. *P. verrucosum* cultivado em casca de maracujá (A, B e C). *P. verrucosum* cultivado em farelo de canola (D, E e F).

### 3.1.1 Validação do Modelo

A validação externa dos modelos para a otimização da produção de  $\beta$ -glicosidase foram realizadas nas seguintes condições: concentração do substrato 2,5%, tempo de cultivo 5,5 dias e pH 5,5 (corrida 18 da Tabela 1). Os índices da atividade de  $\beta$ -glicosidase nesta corrida, para os experimentos com casca de maracujá e farelo de canola, foram utilizados para a modelagem a partir das equações quadráticas geradas pela metodologia de superfície de resposta.

Para a casca de maracujá, o valor experimental da atividade  $\beta$ -glicosidase foi 3,52 U mL<sup>-1</sup>. Este valor foi comparado com a atividade proveniente da modelagem, a qual correspondeu a 3,30 U mL<sup>-1</sup>. Desta forma, a recuperação dos valores de  $\beta$ -glicosidase experimental em relação ao teor preditivo pelo modelo foi de 93,75%. Já para o farelo de canola o valor experimental da atividade  $\beta$ -glicosidase foi 2,64 U mL<sup>-1</sup>. Quando este é comparado ao valor da atividade proveniente da modelagem (1,93 U mL<sup>-1</sup>), a recuperação dos valores de  $\beta$ -glicosidase experimental em relação ao teor preditivo pelo modelo foi de 73,29%.

Os altos valores destas porcentagens mostram as adequações aos modelos gerados, validando-os de forma satisfatória. Assim, o tratamento utilizado para a validação externa se adequou aos modelos gerados, indicando a robustez do delineamento proposto, bem como demonstra que a quimiometria aliada à modelagem matemática pode ser aplicada em estudos de atividades enzimáticas microbianas.

### 3.1.2 Simulação de Dados

No delineamento experimental (DCCR) foram gerados seis modelos matemáticos (Figura 1), três para cada substrato, porém para a simulação foram utilizados apenas quatro modelos, os mais representativos dos experimentos deste estudo. Os modelos codificados permitiram a simulação de dados da produção de  $\beta$ -glicosidase, enquanto que os modelos gerados foram usados para executar as simulações da concentração do substrato e pH em relação ao tempo de cultivo (Figura 2).

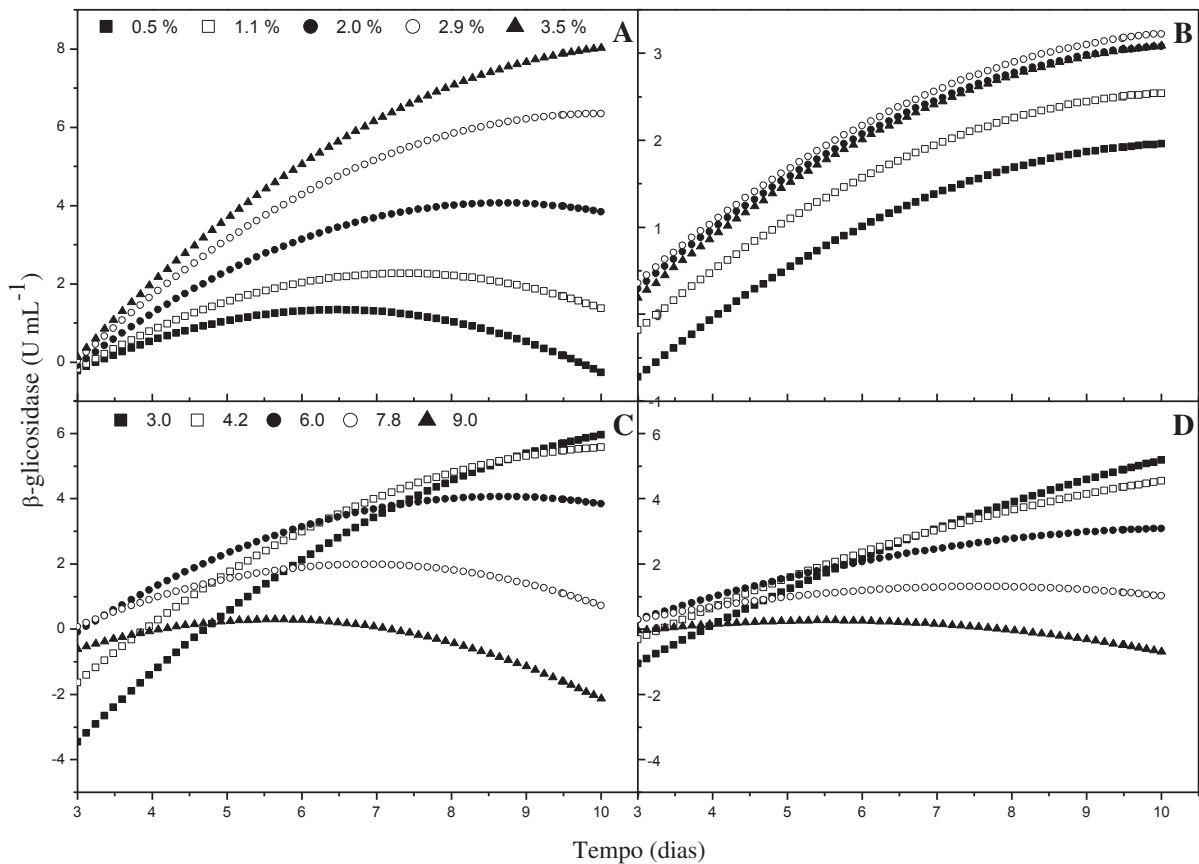
As principais vantagens da simulação e o motivo da sua aplicação em diversas áreas é a simplicidade, realismo e flexibilidade (KLEIJNEN; STANDRIDGE, 1988). A simulação dos dados permite projetar o comportamento dos fatores analisados (concentração do substrato, pH e tempo) em relação a outro fator (como por exemplo, em relação ao intervalo

de tempo testado), enquanto o delineamento (DCCR) analisa pontos específicos, aonde os fatores encontram-se combinados. Assim a simulação complementa a análise dos dados do DCCR a fim de melhor compreender os efeitos dos fatores e definir as melhores condições de cultivo. De tal modo a simulação através de delineamento experimental e análise de regressão podem ser utilizadas para explicar a produção enzimática.

Na simulação da concentração do substrato em relação ao tempo de cultivo para verificar a atividade de  $\beta$ -glicosidase, pode-se observar que quanto maior a concentração do substrato, maior a produção de  $\beta$ -glicosidase. Nota-se, ainda, que o fungo se comportou de forma diferente nos dois substratos, pois em farelo de canola a concentração de 2,9 % induziu maior produção enzimática, mesmo valor encontrado no DCCR, já para casca de maracujá a melhor concentração de substrato foi 3,5%, diferente do encontrado no DCCR, que foi de 2,9 %.

Entretanto, ao analisar a simulação os dados de pH de cultivo em relação ao tempo para averiguar a atividade da  $\beta$ -glicosidase, verifica-se que quanto menor os valores de pH, maior a produção de  $\beta$ -glicosidase, sendo que tanto na simulação quanto no DCCR, o melhor valor de pH foi 4,2.

Desta forma, definimos com base no DCCR e na simulação que as melhores condições para se produzir  $\beta$ -glicosidases por *P. verruculosum* em casca de maracujá é 3,5 % de concentração de substrato, pH 4,2 e tempo de cultivo de 8,6 dias. E em farelo de canola é 2,9 % de concentração de substrato, pH 4,2 e tempo de cultivo de 8,6 dias.



**Figura 2.** Simulação de dados para atividade de  $\beta$ -glicosidase que demonstra a influência da concentração de substrato em relação ao tempo de cultivo de *P. verruculosum* crescido em presença de: (A) casca de maracujá e (B) farelo de canola. Simulação de dados de pH iniciais do meio de cultivo em relação ao tempo de cultivo em *P. verruculosum* crescido em presença de: (C) casca de maracujá e (D) farelo de canola.

## 3.2 Caracterização Enzimática

### 3.2.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

A maior atividade da  $\beta$ -glicosidase foi verificada a 65 °C (Figura 3A), sendo significativo ( $p < 0,01$ ). Nota-se que a atividade enzimática foi aumentando com o aumento da temperatura, a partir de 65 °C a atividade começou a decair acentuadamente, sendo que a 35 °C e 80 °C a atividade relativa da  $\beta$ -glicosidase foi consideravelmente reduzida. Esta também foi a melhor temperatura determinada para as  $\beta$ -glicosidases de *Fusarium solani* BHATTI et al., 2013), *Penicillium sclerotiorum* (WEI et al., 2011) e *Penicillium purpurogenum* (JEYA et

al., 2010). Entretanto, a  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium decumbens* apresentou atividade ótima entre 65-70°C (CHEN et al., 2010),

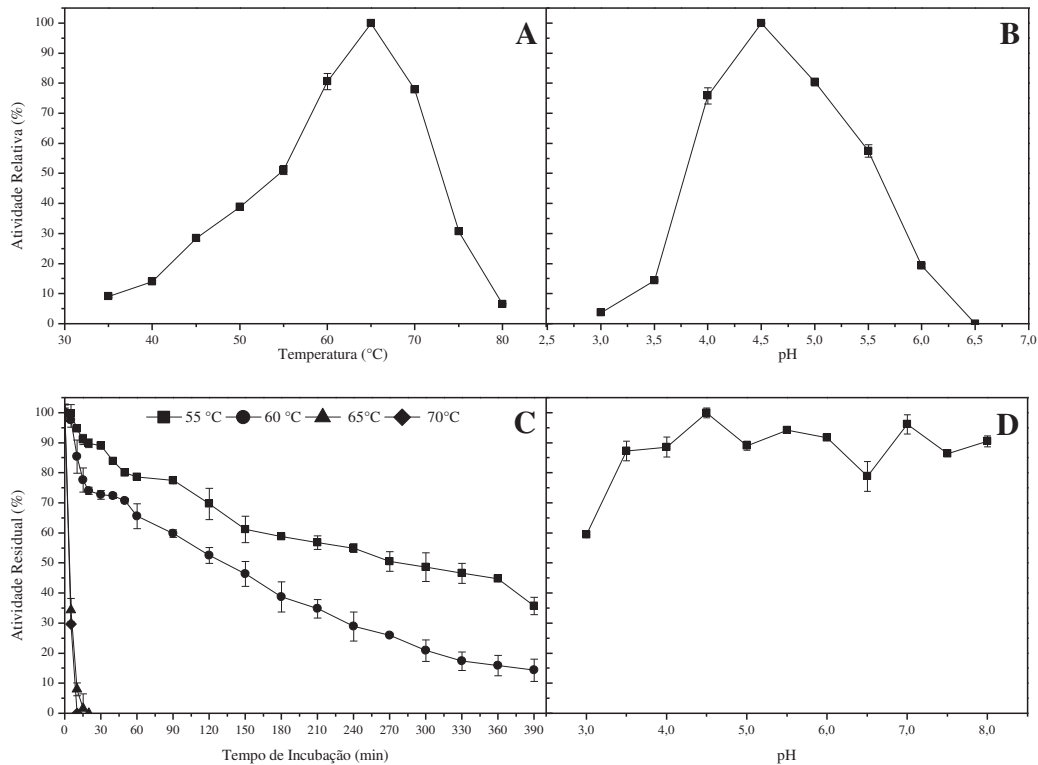
Em relação ao pH, a  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum* apresentou maior atividade relativa em pH 4,5 (Figura 3B), sendo significativo ( $p < 0,05$ ). Este valor também foi encontrado para as  $\beta$ -glicosidases de *Aspergillus awamori* (NAGAYOSHI, et al., 2011), *Fusarium solani* (BHATTI et al., 2013) e *Penicillium sclerotiorum* (WEI et al., 2011). *Penicillium funiculosum* apresentou pH ótimo entre 4,0-5,0 (RAMANI et al., 2012), enquanto que as  $\beta$ -glicosidases provenientes de *Penicillium decumbens* apresentaram atividade ótima entre valores de pH 4,5-5,5 (CHEN et al., 2010).

### 3.2.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Diferentes Valores de pH

A tolerância ao calor é uma característica essencial para a utilização de enzimas em processos industriais. Para verificação da estabilidade térmica, o extrato bruto foi incubado a 55, 60, 65 e 70 °C. A  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum* se mostrou estável em 55 °C e 60 °C, apresentando meia vida ( $T_{1/2}$ ) de 270 e 120 minutos respectivamente (Figura 3C). Em temperaturas superiores a estas, a atividade  $\beta$ -glicosidásica foi consideravelmente baixa. Entretanto, as  $\beta$ -glicosidases de *P. verruculosum* mostram-se bastante estáveis ao serem comparadas com as  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium simplicissimum*, estáveis por 240 minutos a 50 °C (BAI et al., 2013), e as de *Penicillium citrinum*, as quais apresentaram uma meia vida de 120 minutos a 58 °C (NG et al., 2010).

As  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum* apresentaram-se estáveis em uma ampla faixa de pH (3,5-8,0), excetuando-se o pH 3,0 onde apenas 59,47 % da atividade residual foi observada (Figura 3D). Semelhantemente, as  $\beta$ -glicosidases de *Thermotoga thermaruma* foram estáveis no intervalo de pH de 4,0 a 8,0 (ZHAO et al., 2013), enquanto que as  $\beta$ -glicosidases de *Melanocarpus* sp. estáveis apenas em valores de pH 5,0 a 6,0 (KAUR et al., 2007).





**Figura 3.** Influência da temperatura (A), pH (B), estabilidade térmica (C) e estabilidade de pH (D) na atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*. Figura A ( $p < 0,01$ ), figuras B e D ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

A atividade da  $\beta$ -glicosidase foi mensurada na presença de íons metálicos e outros compostos nas concentrações de 2 e 10 mM (Tabela 3), para verificar substâncias ativadoras e inibidoras da respectiva atividade enzimática. Os dados foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5% pela análise de variância (ANOVA).

Uma ativação mais pronunciada da atividade  $\beta$ -glicosidásica foi observada em presença de  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , seguida por citrato de sódio, em concentrações de 2 mM. De modo similar, a ativação por  $\text{Ba}^{2+}$  também foi verificada por Wei et al (2011) em relação as  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium sclerotiorum*, enquanto que o  $\text{Mg}^{2+}$  também foi capaz de ativar a  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus fumigatus* (LIU et al., 2012). Contrariamente a este estudo, as  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium simplicissimum* foram ativadas por  $\text{Mn}^{2+}$  (BAI et al., 2013). A ativação em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol exibida pela  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*



sugere que os grupos sulfidrila estão presentes no sítio ativo da enzima, ou próximos a ele, uma vez que esta substância previne a oxidação dos mesmos.

As  $\beta$ -glicosidases de *P. verruculosum* foram fortemente inibidas por SDS,  $Hg^{2+}$  e  $Mn^{+2}$ , enquanto que  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  e EDTA inibiram moderadamente a atividade enzimática. A inibição da  $\beta$ -glicosidase por  $Hg^{2+}$  sugere a presença de grupos tiol dos resíduos de cisteína em locais ativos da enzima ou em torno deles. A perda da atividade verificada em presença de SDS indica que as interações hidrofóbicas são importantes para manter a estrutura nativa da enzima, enquanto que a redução da atividade em presença do agente quelante EDTA sugere que cátions divalentes são necessários para a ação enzimática. De modo similar, as  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus fumigatus* Z5 foram inibidas por EDTA (LIU et al., 2012), enquanto que sobre as  $\beta$ -glicosidases de *Melanocarpus sp.* o EDTA e o SDS não exerceram efeitos inibitórios (KAUR et al., 2007).

**Tabela 3.** Efeito de diferentes substâncias na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

Substâncias	Concentração	
	2 mM	10 mM
Controle	100,00 $\pm$ 4,47 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 4,56 <sup>bf</sup>
CuSO <sub>4</sub>	125,02 $\pm$ 3,98 <sup>ab</sup>	72,99 $\pm$ 4,96 <sup>e</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	123,01 $\pm$ 1,61 <sup>bg</sup>	104,81 $\pm$ 4,87 <sup>g</sup>
MnSO <sub>4</sub>	88,88 $\pm$ 5,10 <sup>de</sup>	64,34 $\pm$ 2,46 <sup>e</sup>
BaCl <sub>2</sub>	157,61 $\pm$ 2,87 <sup>h</sup>	100,27 $\pm$ 5,09 <sup>bf</sup>
CaCl <sub>2</sub>	125,25 $\pm$ 2,70 <sup>ab</sup>	91,09 $\pm$ 4,86 <sup>ab</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	88,80 $\pm$ 3,98 <sup>de</sup>	101,63 $\pm$ 0,31 <sup>fg</sup>
NaCl	96,76 $\pm$ 4,13 <sup>de</sup>	94,06 $\pm$ 4,80 <sup>af</sup>
SDS	53,44 $\pm$ 3,93 <sup>f</sup>	7,22 $\pm$ 2,22 <sup>i</sup>
MgSO <sub>4</sub>	146,64 $\pm$ 0,84 <sup>ch</sup>	102,32 $\pm$ 1,06 <sup>fg</sup>
Citrato de sódio	136,22 $\pm$ 2,70 <sup>ac</sup>	116,04 $\pm$ 3,60 <sup>c</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	125,17 $\pm$ 3,93 <sup>ab</sup>	74,78 $\pm$ 5,06 <sup>de</sup>
HgCl <sub>2</sub>	59,07 $\pm$ 4,82 <sup>f</sup>	40,91 $\pm$ 4,93 <sup>h</sup>
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	89,19 $\pm$ 1,19 <sup>de</sup>	104,90 $\pm$ 4,59 <sup>g</sup>
EDTA	87,56 $\pm$ 4,46 <sup>e</sup>	84,52 $\pm$ 1,48 <sup>ad</sup>
$\beta$ -mercaptoetanol	112,74 $\pm$ 4,21 <sup>g</sup>	120,77 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>

Letras iguais denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística significativa entre as espécies químicas analisadas (<0,05).

### 3.2.4 Tolerância a Glicose

Comumente a glicose, o produto final da reação enzimática da  $\beta$ -glicosidase, inibe a ação desta enzima, onde o substrato e o produto disputam o sítio ativo da enzima, num mecanismo de competição (KRISCH et al., 2010). De acordo com Teugjas e Valjamae (2013), a inibição da  $\beta$ -glicosidase por glicose é um grande obstáculo na hidrólise enzimática da celulose. Por esta razão, a sensibilidade à glicose é um fator importante a ser avaliado.

Por meio da realização do experimento de tolerância à glicose (Figura 4), verifica-se que quando a concentração de glicose aumenta, a atividade da  $\beta$ -glicosidase diminui gradativamente, evidenciando a sua inibição pelo aumento da concentração de glicose.

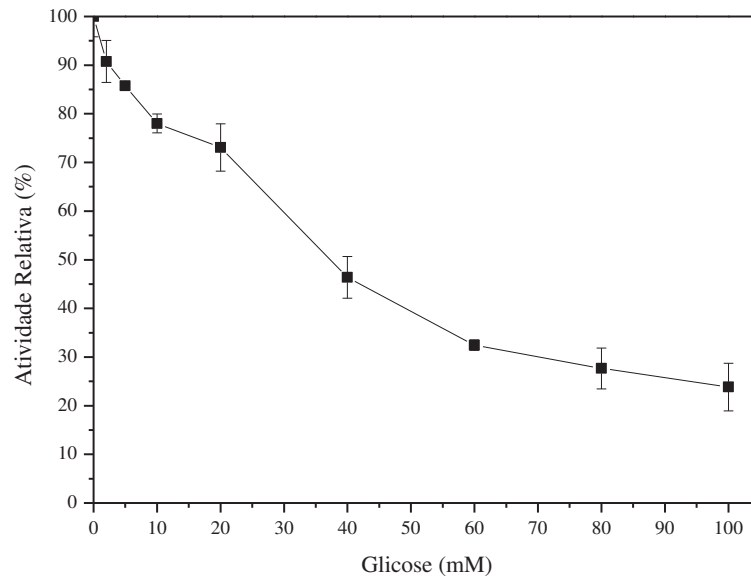
O  $K_i$  da  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum* foi calculado através da regressão de probitos ( $p < 0,01$ ), obtendo-se um  $K_i$  previsto de 51,70 mM, com  $R = 0,9986$ ,  $R^2 = 0,9972$  e  $R^2$  ajustado = 0,9971. A análise de probitos gerou a seguinte equação de regressão:

$$\text{Atividade Relativa \%} = 0,1048 + 0,0076 \times \quad (7)$$

Onde x é a concentração de glicose (mM).

O valor encontrado para o  $K_i$  de 51,70 mM neste trabalho é um valor expressivo quando comparado com o  $K_i$  apresentado por outras  $\beta$ -glicosidases de fungos do gênero *Penicillium* tais como de *Penicillium italicum*, as quais apresentaram um valor de  $K_i$  de 8,9 mM (PARK et al., 2012), as de *Penicillium pinophilum*, onde o valor de  $K_i$  correspondeu a 26,6 mM (JOO et al., 2010), as produzidas por *Penicillium purpurogenum*, as quais exibiram um  $K_i$  de 21,5 mM (JEYA et al., 2010), bem como as de *Penicillium verruculosum* com  $K_i$  de 0,093 mM (KOROTKOVA et al., 2009).

Desta forma, o emprego das  $\beta$ -glicosidases de *P. verruculosum* mostra-se vantajosa, uma vez que pode apresentar maior eficiência na sacarificação de materiais lignocelulósicos.



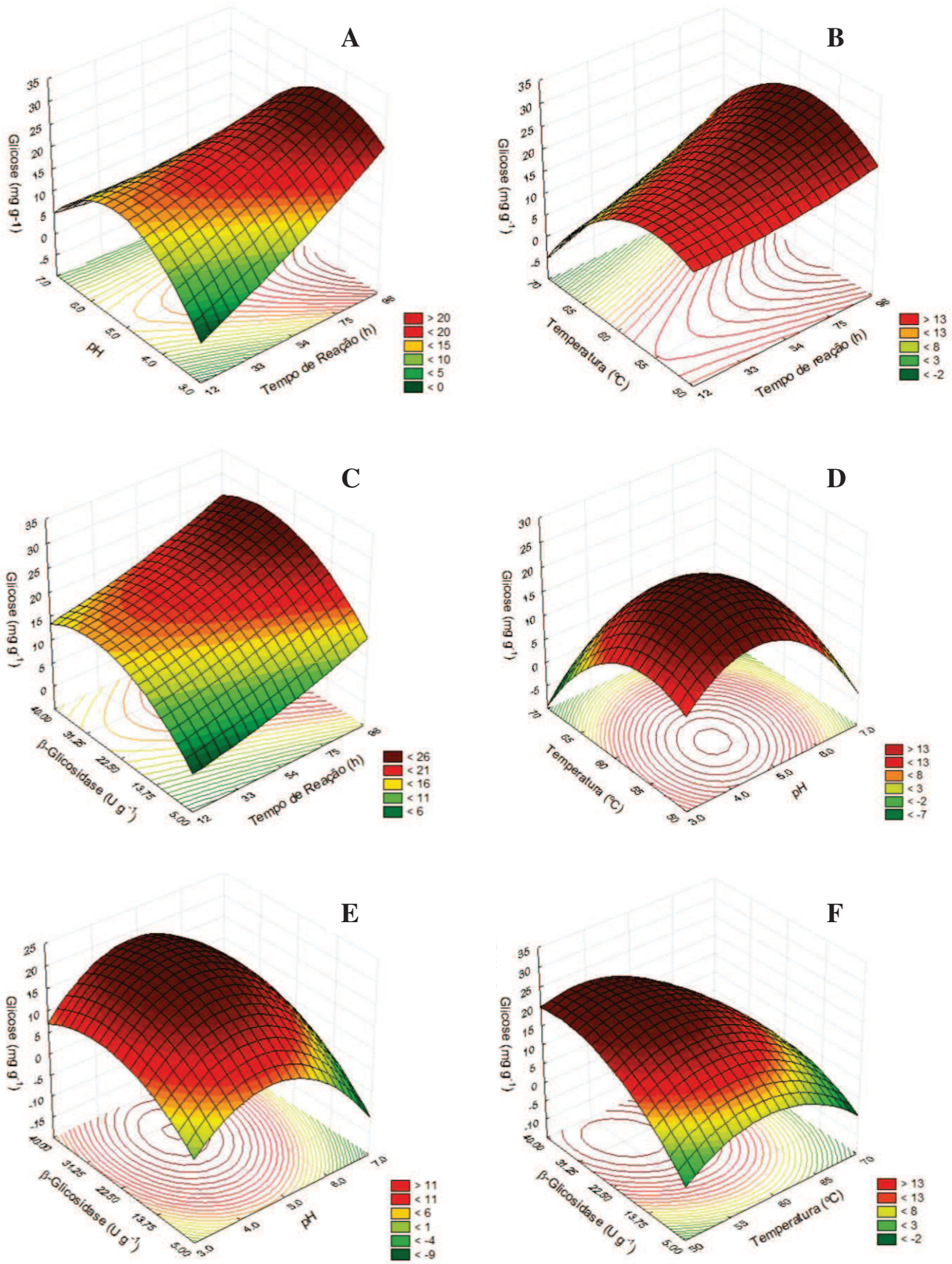
**Figura 4.** Efeito da glicose na atividade da  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

### 3.3 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da casca de maracujá pré-tratada pelo método alcalino foi realizada, através de Metodologia de Superfície de Resposta por Delineamento Central Composto Rotacional, onde foram analisados 4 fatores: tempo, pH, temperatura e concentração da enzima. O objetivo deste delineamento experimental foi estabelecer as melhores condições de hidrólise enzimática, com a finalidade de maximizar a liberação de glicose, a partir deste substrato.

As curvas das superfícies de resposta estão apresentadas na Figura 5 e mostram os efeitos dos fatores tempo, pH, temperatura e concentração da enzima na hidrólise enzimática da casca de maracujá, bem como determinam os pontos ótimos para cada variável para a máxima reposta de glicose liberada.

Os valores reais e codificados e os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 4, onde os tratamentos de 1 a 27 fazem parte do planejamento, enquanto que a corrida 28 refere-se à validação do modelo.



**Figura 6.** Superfície de resposta para liberação de glicose em função do pH e tempo (A); Temperatura x Tempo (B); Enzima x Tempo (C); Temperatura x pH (D); Enzima x pH (E) e Enzima x Temperatura (F), para hidrólise enzimática de casca de maracujá com extrato bruto de *P. verruculosum*.

**Tabela. 4.** Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para hidrólise enzimática da casca de maracujá com a liberação de glicose.

Corrida	Tempo (h)	Valores reais (codificados)			Resposta
		pH	Temperatura (°C)	Enzima (U g <sup>-1</sup> )	Glicose (mg/g de substrato)
1	33 (-1)	4,0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	14,36
2	33 (-1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25(1)	17,04
3	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	3,75
4	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,25(1)	7,91
5	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	5,76
6	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25(1)	18,25
7	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	2,87
8	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25(1)	5,63
9	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	17,58
10	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25(1)	25,64
11	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	12,21
12	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,251	16,71
13	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	6,16
14	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25 (1)	15,16
15	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	6,43
16	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25 (1)	8,11
17	12 (-2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	14,36
18	96 (-2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	32,02
19	54 (0)	3,0 (-2)	60 (0)	22,50 (0)	7,91
20	54 (0)	7,0 (2)	60 (0)	22,50 (0)	9,59
21	54 (0)	5,0 (0)	50 (-2)	22,50 (0)	18,05
22	54 (0)	5,0 (0)	70 (2)	22,50 (0)	6,03
23	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	5,00 (-2)	9,79
24	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	40,00 (2)	20,27
25	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	19,39
26	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	19,66
27	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	20,60
28*	45	4,50	58	18,00	21,27

\* Valores referentes à validação do modelo.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo está resumida na Tabela 5. O modelo foi significativo ( $p < 0,05$ ). Ao se considerar o teste  $F$ , o modelo foi preditivo, pois o valor de  $F$  calculado foi maior do que o valor de  $F$  tabelado. O coeficiente de determinação  $R^2$  de 0,8710 indica que 87,10% da variabilidade dos dados pode ser explicada por este modelo.

**Tabela. 5.** Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir de casca de maracujá hidrolisada por extrato bruto de *P. verruculosum*, e os valores de R<sup>2</sup> e F-valor.

Glicose						
Termos	SQ	MQ	gl	F	F tab	F/Ftab
M	1182,275	236,455	5	28,37	2,68	10,59
R	175,033	8,335	21	-	-	-
T	1357.308	-	26			
R <sup>2</sup>	0,8710					

Termos	Coefficientes	p-valor
Média/Interc.	<b>19,885</b>	<b>0,000</b>
T	<b>2,823</b>	<b>0,004</b>
T <sup>2</sup>	0,279	0,742
pH	<b>-1,810</b>	<b>0,039</b>
pH <sup>2</sup>	<b>-3,330</b>	<b>0,002</b>
Temp	<b>-3,349</b>	<b>0,001</b>
Temp <sup>2</sup>	<b>-2,508</b>	<b>0,010</b>
E	<b>2,761</b>	<b>0,004</b>
E <sup>2</sup>	-1,761	0,055
T x pH	-1,607	0,118
T x Temp	0,886	0,372
T x E	0,071	0,942
pH x Temp	0,734	0,457
pH x E	0,407	0,677
Temp x E	-1,196	0,234

Os dados obtidos de conversão de glicose foram analisados por regressão linear múltipla e as respostas previstas foram de acordo com a equação 6, levando-se em consideração apenas os termos significativos:

$$Gli = 19,885 + 2,823T - 1,810pH - 3,330pH^2 - 3,349Temp - 2,508Temp^2 + 2,761E \quad (6)$$

Onde Gli é glicose, T é tempo, Temp é temperatura, pH é potencial hidrogeniônico e E é a concentração da enzima.

Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 4. Por meio da análise do p-valor, observa-se que os quatro termos lineares das variáveis independentes, a saber, tempo, temperatura, pH e concentração da enzima foram significativos, enquanto que para os termos quadráticos somente o pH e a temperatura foram significativos. Em relação às interações entre os termos, nenhuma foi significativa. Desta forma, pode-se concluir que para a hidrólise de casca de maracujá com o extrato enzimático bruto de *P. verruculosum*, a variável mais importante é a temperatura linear, seguida pelo pH quadrático, tempo linear, concentração da enzima linear, temperatura quadrática e pH linear, sendo que quando a temperatura e o pH



são diminuídos e o tempo e a concentração da enzima são aumentados, a taxa de hidrólise é favorecida.

As condições de hidrólise enzimática onde houve maior taxa de conversão de glicose foram 96 horas de incubação, pH 5,0, temperatura de 60 °C e concentração da enzima de 22,50 U g<sup>-1</sup> (corrida 18). Nestas condições, a quantidade de glicose obtida correspondeu a 32,02 mg/g de substrato ou 6,40 g L<sup>-1</sup>. Desta forma, um alto grau de conversão da casca de maracujá em glicose foi obtido por meio da utilização do extrato bruto de *P. verruculosum*, correspondendo a 45,07 %. Os valores de glicose verificados são superiores a muitos reportados na literatura. O máximo grau de sacarificação observado por Mahamud e Gomes (2011) ao hidrolisar o bagaço de cana com o extrato bruto de *Trichoderma* sp. foi de 37,29 %. Sangkaharak (2011) avaliou o potencial das celulases produzidas por *A. niger* e *T. viride* em hidrolisar resíduos de papel, obtendo uma conversão em glicose de 37,03 %. Similarmente a este estudo, 46 % de glicose foram obtidos a partir dos açúcares presentes nos resíduos de milho pré-tratados, quando hidrolisados pelo extrato bruto de *Trichoderma reesei* (MTUI, 2012).

Ao empregar o extrato enzimático bruto de *Fomitopsis palustres*, Yoon e Kim (2005) obtiveram 1,6 mg de glicose a partir de um grama de Avicel, um substrato essencialmente celulósico, enquanto que a casca de maracujá empregada neste estudo, além de celulose, constitui-se de hemicelulose, lignina, pectina e outros compostos. Mostafa et al. (2013) avaliaram a hidrólise da casca de limão utilizando os extratos brutos de *Penicillium funiculosum* e *Penicillium pinophilum*, obtendo ao máximo 29,91 mg/g de glicose a partir do substrato acima citado.

Kumar e colaboradores (2011) estabeleceram como melhores condições de hidrólise da serragem da madeira pelo extrato bruto de *Aspergillus fumigatus* 30 °C e pH 5,0, onde a liberação de 1,69 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores foi observada. Ao empregar o extrato bruto de *A. niger* no processo de sacarificação da biomassa, Dhillon et al. (2012) obtiveram 16,1 e 18,1 mg de glicose a partir de um grama do bagaço de maçã e do bagaço de malte, respectivamente.

### 3.3.1 Validação do Modelo

A validação externa do modelo para a hidrólise enzimática de casca de maracujá foi realizada nas seguintes condições: tempo de hidrólise 45 horas, pH 4,5, temperatura 58 °C e



concentração da enzima de  $18 \text{ U g}^{-1}$  (corrida 28 da Tabela 3). O índice de glicose obtida nesta corrida foi utilizado para a modelagem a partir da equação quadrática gerada pela metodologia de superfície de resposta.

O valor de glicose liberada no experimento foi de  $21,27 \text{ mg/g}$  de substrato, enquanto que a produção proveniente da modelagem correspondeu a  $20,19 \text{ U mL}^{-1}$ . Desta forma, a recuperação da modelagem foi de  $94,90\%$ . Este alto valor demonstra a adequação ao modelo gerado, validando-o de forma satisfatória.

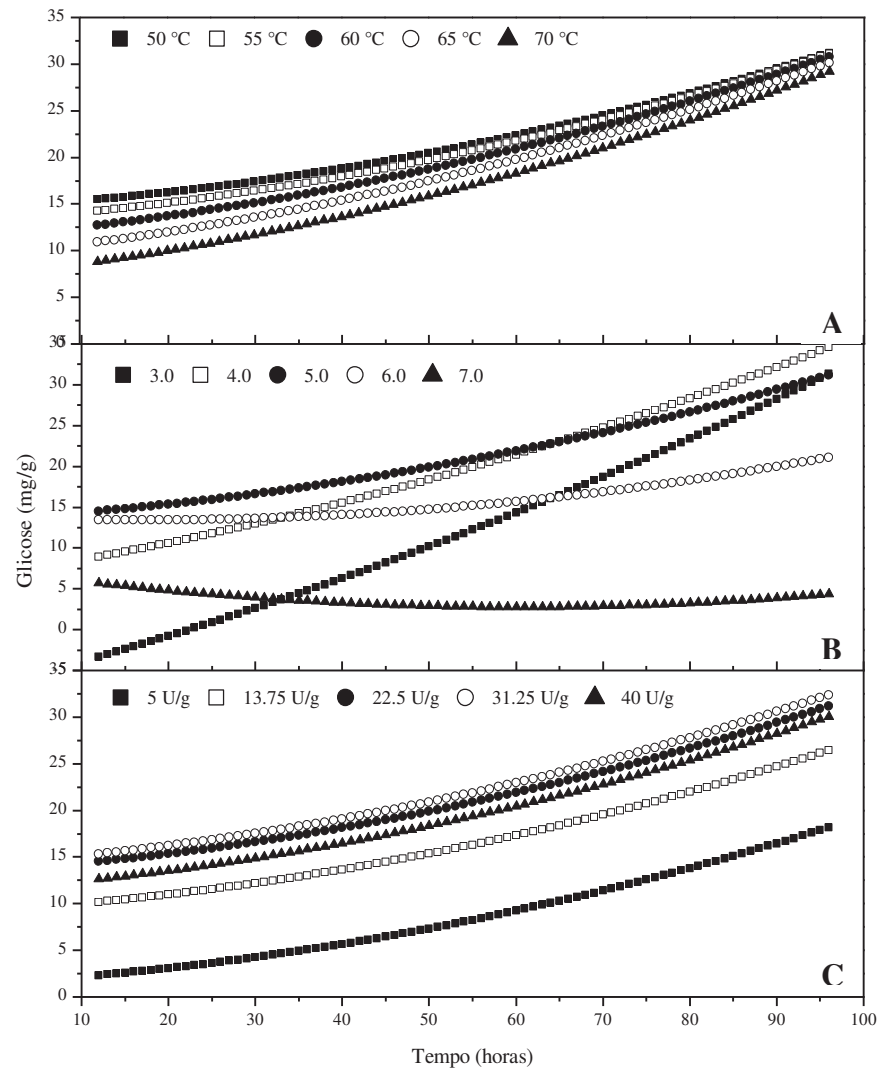
### 3.3.2 Simulação de Dados

Seis modelos matemáticos foram gerados no DCCR (Figura 05), no entanto, para a simulação foram utilizados apenas três modelos, que melhor representaram os experimentos de hidrólise. O modelo codificado permitiu a simulação de dados da concentração de glicose, enquanto que o modelo gerado foi usado para executar as simulações da temperatura, pH e concentração da enzima em relação ao tempo de hidrólise (Figura 06).

Para a simulação da temperatura em relação ao tempo pode-se observar que quanto menor a temperatura, maior a concentração de glicose liberada. Verifica-se que no tempo de 96 horas, a melhor temperatura de hidrólise ficou em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , o mesmo encontrado no DCCR. Para a simulação do pH em relação ao tempo, o melhor valor de pH foi 4,0, diferente do encontrado no DCCR, que foi pH 5,0. Resultados que corroboram com as características da enzima, que foi estável por 4 horas em  $55^\circ\text{C}$ , e o pH ótimo e melhor estabilidade de pH foi em 4,5.

Para a simulação da concentração da enzima em relação ao tempo a melhor concentração foi de  $31,25 \text{ U g}^{-1}$ , enquanto que no DCCR foi de  $22,50 \text{ U g}^{-1}$ .

Desta foram concluiu-se que as melhores condições para realizar a hidrólise enzimática da casca de maracujá pelo extrato bruto de *P. verruculosum* é 96 horas, temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 4,0 e concentração da enzima  $31,25 \text{ U g}^{-1}$ .



**Figura 7.** Simulação dos dados de liberação de glicose que demonstra a influência da temperatura (A), pH (B) e concentração da enzima (C) em relação ao tempo de hidrólise da casca de maracujá pelo extrato bruto de *P. verruculosum*.

#### 4. Conclusão

Neste estudo, elevados níveis de  $\beta$ -glicosidases foram produzidos por *P. verruculosum* quando cultivado em presença de casca de maracujá, uma fonte alternativa de carbono gerada em grandes quantidades e de baixo custo, até então pouco explorada. O extrato bruto de *P. verruculosum* mostrou-se eficiente em hidrolisar a casca de maracujá, obtendo-se altos níveis de glicose. As enzimas produzidas apresentaram propriedades interessantes, como boa estabilidade térmica, estabilidade em uma ampla faixa de pH e alta tolerância a glicose. A modelagem matemática e simulação foram ferramentas imprescindíveis para definir as melhores condições de produção e hidrólise enzimática. Adicionalmente, o Delineamento Central Composto Rotacional e a Metodologia de Superfície de Resposta mostraram-se metodologias adequadas para otimização de processos de produção e caracterização de  $\beta$ -glicosidases produzidas por *P. verruculosum*. Assim, evidencia-se por meio deste estudo, e por meio de DCCR e MSR uma excelente alternativa para redução dos custos de produção de  $\beta$ -glicosidases, bem como para o aumento de eficiência de hidrólise da biomassa lignocelulósica, os dois grandes desafios a serem superados a fim de disponibilizar açúcares fermentáveis para aplicação em diversos bioprocessos.

## 5. Referências Bibliográficas

- ADSUL, M.G.; SINGHVI, M.S.; GAIKAIWARI, S.A.; GOKHALE D.V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4304–4312, 2011.
- AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; VERMA, A.K. Development of a  $\beta$ -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. **3 Biotech** v. 3, n. 5, p. 381–388, 2013.
- BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y.; HAN, X.; YANG, Q. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 528-540, 2013.
- BEITEL, S.M.; KNOB, A. *Penicillium miczynskii*  $\beta$ -glucosidase: A glucose-tolerant enzyme produced using pineapple peel as substrate. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 293-300, 2013.
- BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 2-19, 2012.
- BHATTI, H.N.; SAMIA, BATOOL; NOSHEEN, A. Production and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from *Fusarium solani*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 1, p. 140–144, 2013.
- CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE. Institut international du Canada pour le grain. **Canola Meal**. Feed Industry Guide. 4. ed. Manitoba, 2009.
- CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N.L. Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-8, 2010.
- CHEN, M.; QIN, Y.; LIU, Z.; LIU, K.; WANG, F.; QU, Y. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 444–449, 2010.
- DHILLON, G. S.; BRAR, S.K.; KAUR, S.; METAHNI, N.; M’HAMDI, N. Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, p. 165-174, 2012.
- FALLER, D.; KLINGMÜLLER, U.; TIMMER, J. Simulation methods for optimal experimental design in systems biology. **Simulation**, v. 79, n. 12, p. 717-725, 2003.
- FERREIRA, M.F.P.; PENA, R.S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2010.

GAO, Z.; HOP, D.V.; YEN, L.T.H.; ANDO, K.; HIYAMUTA, S.; KONDO, R. The production of  $\beta$ -glucosidases by *Fusarium proliferatum* NBRC109045 isolated from Vietnamese forest. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 49, 2012.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOTTSCHALK, L.M.F.; PAREDES, R.S.; TEIXEIRA, R.S.S.; DA SILVA, A.S.; BON, E.P.S. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase,  $\beta$ -xylosidase, ferulic acid esterase and  $\beta$ -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 569–76, 2013.

JEYA M.; JOO A.R.; LEE K.M.; TIWARI M.K.; LEE K.M.; KIM S.H.; LEE J.K. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p.1473–1484, 2010.

JOO, A.R.; JEYA, M.; LEE, K.M.; LEE, K.M.; MOONA, H.J.; KIM, Y.S.; LEE, J.K. Production and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 851–858, 2010.

KAUR, J.; CHADHA, B.S.; KUMAR, B.A.; KAUR, G.S.; SAINI, H.S. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 260-270, 2007.

KLEIJNEN, J.P.C.; STANDRIDGE, C.R. Experimental design and regression analysis in simulation: An FMS case study. **European Journal of Operational Research**, v. 33, v. 3, p. 257-261, 1988.

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

KOROTKOVA, O.G.; SEMENOVA, M.V.; MOROZOVA; V.V.; ZOROV, I.N.; SOKOLOVA, L.M.; BUBNOVA, T.M.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of fungal  $\beta$ -Glucosidases. **Biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 569-577, 2009.

KRISCH, J.; TAKÓ, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from *Zygomycetes*. **Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, p. 891-896, 2010.

KUMAR, D.; YADAV, K.; SINGH, M. Hydrolysis of wood saw dust by combined chemical pretreatment and enzymatic methods for lignocellulosic saccharification. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 2, p. 29-31, 2011.

LAN, T.Q.; WEI, D.; YANG, S.T.; LIU, X. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 175–182, 2013.

LIU, D.; ZHANG R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X3. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-25, 2012.

LIU, G.; QIN, Y.; LI, Z.; QU, Y. Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 962–975, 2013.

MAHAMUD, M.R.; GOMES, D.J. Enzymatic saccharification of sugar cane bagasse by the crude enzyme from indigenous fungi. **Journal of Scientific Research**, v. 4, p. 227-238, 2012.

MOSTAFA, F.A.; AHMED, S.A.; HELMY, W.A. Enzymatic saccharification of pretreated lemon peels for fermentable sugar production. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9 p. 2301-2310, 2013.

MTUI, G.Y.S. Oxalic acid pretreatment, fungal enzymatic saccharification and fermentation of maize residues to ethanol. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 843-851, 2012.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journals Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.

NAGAYOSHI E.; FURUTA H.; FUJII K.; TAKII Y. Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced from *Aspergillus awamori* MIBA335. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 11, n. 3, p. 69-82, 2011.

NAVYA, P.N.; ROOPALI N.B.; PUSHPA S.M. Improved  $\beta$ -Glucosidase production from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. **International Journal of Current Research**, v. 4, n. 8, p. 123-129, 2012.

NG I.S.; LI C.W.; CHAN S.P.; CHIR J.L.; CHEN P.T.; TONG C.G.; YU S.M.; HO T.H.D. High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1310–1317, 2010.

PARK, A.R.; HONG, J.H.; KIM, J.J.; YOON, J.J. Biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, isolated from rotten citrus peel. **Mycobiology**, v. 40, n. 3, p.173-180, 2012.

QIAN, L.C.; FU, S.J.; ZHOU, H.M.; SUN, J.Y.; WENG, X.Y. Optimization of fermentation parameters for  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus niger*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 5, p. 583-591, 2012.

RAMANI, G.; MEERA, B.; VANITHA, C.; RAO, M.; GUNASEKARAN, P. Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n.5, p. 959–972, 2012.

SANGKHARAK, K. Optimization of enzymatic hydrolysis for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of wastepaper. **Waste management & Research**, v. 29, p. 1134-1144, 2011.

SEDMAK J. J.; GROSSBERG S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.

SINGHANIA, R.R., PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A. Plant-Based Biofuels: An Introduction. In: PANDEY, A. **Handbook of Plant-Based Biofuels**, 6. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009, cap. 1, p. 3-12.

SØRENSEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; AHRING, B.K. Fungal Beta-Glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612-631, 2013.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 104, 2013.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.

WEI, Y.; ZHAO, W.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Purification and characterization of a novel and unique ginsenoside Rg1-hydrolyzing  $\beta$ -D-Glucosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, n. 3, p. 226-231, 2011.

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 295-299, 2009.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.Y.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421-450, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, n. 86, p. 88-95, 2004.

YOON, J.J.; KIM, Y.K. Degradation of crystalline cellulose by the Brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 487-492, 2005.

ZHAO, L.; XIE, J.; ZHANG, X.; CAO, F.; PEI, J. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb1 to Rd. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 62-69, 2013.

ZIMBARDI, A.L.R.L.; SEHN, C.; MELEIRO, L.P.; SOUZA, F.H.M.; MASUI, D.C.; NOZAWA, M.S. F.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 2875-2902, 2013.



## CAPÍTULO II

### UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE $\beta$ -GLICOSIDASE POR *Trichoderma viride* E SUA APLICAÇÃO NO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO

#### Resumo

A hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica é um grande obstáculo para conversão destes abundantes materiais em energia, sendo o custo de produção de enzimas celulolíticas como as  $\beta$ -glicosidases o principal fator limitante para a viabilização deste processo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer as melhores condições de cultivo de uma linhagem de *Trichoderma viride* para a produção de  $\beta$ -glicosidase, assim como empregar as enzimas produzidas no processo de hidrólise de casca de maracujá. Os experimentos foram realizados em Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Após a otimização, a máxima produção de  $\beta$ -glicosidases obtida em presença de farelo de canola e casca de maracujá correspondeu a  $1,35 \text{ U mL}^{-1}$  e  $1,23 \text{ U mL}^{-1}$ , respectivamente. As enzimas produzidas em farelo de canola apresentaram atividade ótima em temperatura de  $60\text{-}65 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 4,5, sendo estáveis a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  por 210 minutos. Estas enzimas apresentaram um  $K_i$  de  $50,33 \text{ mM}$ . A máxima liberação de glicose a partir da hidrólise da casca de maracujá correspondeu a  $9,43 \text{ g L}^{-1}$ . Por meio dos estudos realizados é possível verificar que o farelo de canola apresenta-se como uma boa alternativa para produção de  $\beta$ -glicosidases por *T. viride*. Adicionalmente, as enzimas produzidas nestas condições apresentam potencial de aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, especialmente a casca de maracujá, onde elevados índices de conversão em glicose foram observados.

**Palavras-chave:** casca de maracujá, farelo de canola,  $\beta$ -glicosidases, hidrólise, *T. viride*.

## 1. Introdução

Os resíduos agroindustriais constituem uma abundante fonte de biomassa lignocelulósica, sendo gerados continuamente em grandes proporções pelos setores agrícolas e industriais (BHATIA et al., 2012). Atualmente, essas matérias-primas de baixo custo apresentam-se como uma excelente alternativa para a produção de enzimas e para o processo de hidrólise, a fim de gerar açúcares fermentáveis e outros produtos de interesse biotecnológico (SÁNCHEZ, 2009). Porém, a alta recalcitrância da matriz lignocelulósica é a maior barreira para utilização destes materiais na geração de energia e outros produtos químicos (SWEENEY; XU, 2012). Sua estrutura altamente organizada e complexa constituída por celulose, hemicelulose e lignina confere proteção ao ataque biológico, impedindo que estes materiais sejam facilmente convertidos (ADSUL et al., 2011).

As enzimas endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, são responsáveis pela degradação da celulose na natureza, sendo os fungos do gênero *Trichoderma* os organismos mais amplamente conhecidos e estudados pela grande produção enzimática deste complexo celulolítico. No entanto, baixas concentrações de  $\beta$ -glicosidases são geralmente produzidas por estes microrganismos (TIWARI et al., 2013). Estas enzimas, além de realizarem a conversão de celo-oligossacarídeos e de celobiose em glicose, regulam a atividade das endoglucanases e exoglucanases (enzimas que realizam as reações primárias da hidrólise da celulose), por meio do controle da concentração de celobiose no meio, o qual é inibidor da atividade destas enzimas (PEI et al., 2012). Assim, a  $\beta$ -glicosidase é uma das enzimas centrais no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Atualmente, o processo enzimático de hidrólise da biomassa lignocelulósica, apesar de ser considerado de grande potencialidade, enfrenta várias barreiras tecnológicas, sendo o elevado custo das enzimas o principal deles. Devido à resistência à degradação apresentada pela celulose, este processo requer doses enzimáticas elevadas. Devido a esses altos níveis de consumo, as enzimas requeridas para hidrolisar a celulose possuem um grande impacto econômico na obtenção de produtos de interesse e de biocombustíveis, como o etanol (ZHANG et al., 2006; MEYER et al., 2009). Visto que o processo ainda é economicamente inviável, o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo é justificável.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi determinar os parâmetros ótimos de produção de  $\beta$ -glicosidase por *Trichoderma viride* empregando-se a casca de maracujá e farelo de canola como substratos, bem como realizar a hidrólise da casca de maracujá por meio do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e da Metodologia de Superfície

de Resposta (MSR). Adicionalmente, as enzimas  $\beta$ -glicosidases produzidas foram bioquimicamente caracterizadas.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Microorganismo e Condições de Cultivo

*T. viride* empregado neste estudo pertence à coleção do Centro de Estudos Ambientais da UNESP. Esta linhagem foi inicialmente isolada a partir de solo de Mata Atlântica, proveniente da Estação Ecológica Juréia-Itatins, Peruíbe, São Paulo - Brasil.

O fungo foi cultivado em meio sólido de Vogel (1956), contendo 1,5 % de glicose e 1,5% ágar, a 28 °C, durante sete dias para produção de esporos. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lã de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas em câmara de Neubauer para  $1,0 \times 10^7$  esporos mL<sup>-1</sup>. Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, suplementados com diferentes fontes de carbono e diferentes valores de pH, os valores de fonte de carbono e pH foram definidos de acordo com cada experimento do delineamento composto central rotacional descrito a seguir.. Após o crescimento em meio líquido por períodos pré-estabelecidos nos planejamentos descritos posteriormente, as culturas foram filtradas a vácuo em funil *Büchner*. Desta forma, o filtrado do meio de cultivo livre de células foi obtido, o qual foi utilizado como fonte de enzimas e de proteínas extracelulares, bem como o micélio, o qual foi empregado para a determinação de proteínas intracelulares.

### 2.2 Determinação da Atividade Enzimática e Proteínas

A determinação da atividade  $\beta$ -glicosidásica foi realizada por meio da incubação de 0,2 mL de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNPG) 5 mM em tampão McIlvane pH 5,0 e 0,3 ml do filtrado enzimático apropriadamente diluído em tampão McIlvane pH 5,0 a 50 °C. Após período de incubação apropriados, a reação foi paralisada pela adição de 2,0 ml de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de *p*-nitrofenol por ml, por minuto de reação, nas condições de ensaio.

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford modificado (SEDMAN; GROSSBERG, 1977), utilizando como referência uma curva de calibração padrão de albumina de soro bovino (BSA).

### 2.3 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

A fim de elevar os níveis de  $\beta$ -glicosidase produzidos por *T. viride*, as condições de cultivo foram otimizadas através do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e as respostas das atividades  $\beta$ -glicosidásicas foram analisadas pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Os experimentos foram realizados por  $2^3$  fatorial: concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH do meio de cultivo, com cinco níveis, gerando 17 combinações de tratamentos com três amostras no ponto central e seis pontos axiais. A corrida 18 foi utilizada como validação externa nos modelos quadráticos gerados. Dois planejamentos experimentais foram realizados: *T. viride* cultivado em meio com casca de maracujá e com farelo de canola.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a seguinte equação polinomial de segunda ordem (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta prevista;  $\beta_0$  representa a interseção;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  são os coeficientes lineares,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  são os coeficientes quadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  são os coeficientes de interação e  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , são as variáveis independentes, concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente. O termo  $\varepsilon$  representa o erro experimental (BARROS NETO et al., 2001).

## 2.4 Caracterização Enzimática

### 2.4.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

A fim de determinar a temperatura ótima das  $\beta$ -glicosidases produzidas, a atividade enzimática foi avaliada em uma faixa de temperatura de 30 °C a 80 °C, em intervalos de 5 °C,

em tampão McIlvane pH 5,0. O pH ótimo da atividade enzimática foi avaliado em tampão McIlvane na faixa de pH de 3,0 a 6,5, em intervalos de 0,5 unidades, sob a temperatura ótima previamente estabelecida.

#### 2.4.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Valores de pH

A estabilidade térmica foi determinada após incubação do extrato bruto em 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C em diferentes intervalos de tempo, em pH ótimo. A fim de avaliar a estabilidade enzimática frente ao pH, o extrato bruto diluído (1:2 v/v) em tampão McIlvane foi incubado em valores de pH de 3,0 a 8,0, a 4 °C. Após 24 horas, a atividade residual  $\beta$ -glicosidásica foi determinada.

#### 2.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

O efeito de alguns íons metálicos e outras substâncias sobre a atividade  $\beta$ -glicosidásica nas concentrações de 2 mM e 10 mM foi verificado. As reações enzimáticas foram conduzidas nas condições ótimas previamente estabelecidas.

#### 2.4.4 Determinação do $K_i$

Para verificar a tolerância das  $\beta$ -glicosidases ao produto final de reação, 0,2 mL do substrato PNPG 5 mM foram incubados juntamente com o extrato bruto e glicose em diversas concentrações (2 a 100 mM), de modo a completar um volume de 0,3 mL. Posteriormente, a atividade  $\beta$ -glicosidásica foi determinada nas condições ótimas de temperatura e pH previamente estabelecidas. O parâmetro cinético de inibição ( $K_i$ ) foi determinado, sendo este definido como a quantidade de glicose necessária para inibir 50% da atividade da  $\beta$ -glicosidase. Os dados foram analisados por regressão de Probitos, com limite de confiança de 1%.

Todos os ensaios de caracterização enzimática foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

## 2.5 Hidrólise Enzimática da Casca de Maracujá

Antes da hidrólise enzimática, o pré-tratamento alcalino foi realizado para aumentar o teor de celulose na casca de maracujá, através da eliminação parcial da fração de legnina, de acordo com Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006). Para isso, a casca de maracujá foi tratada com NaOH a 4 % e autoclavada a 121 °C durante 30 minutos. Em seguida, o substrato foi lavado com água destilada. O efeito alcalino foi ainda mais neutralizado com adição de ácido fosfórico diluído, em seguida a mistura foi seca a 70 °C.

A hidrólise enzimática da casca de maracujá, empregando-se o extrato bruto de *T. viride* crescido em farelo de canola, foi realizada de acordo com o método proposto por Ghose (1987). Para tal, 300 mg de casca de maracujá pré-tratada foram incubados em tampão McIlvane. Os frascos foram pré-incubados em água nas diferentes temperaturas de hidrólise testadas, durante 10 minutos para aclimação, após o filtrado bruto de *T. viride* foi adicionado para iniciar a hidrólise. Quantidades variáveis de tampão e filtrado bruto foram adicionados a um volume final de 5 mL, de acordo com o desenho experimental. Foram recolhidas amostras após períodos pré-estabelecidos, que foram imediatamente resfriadas em gelo e centrifugadas a 5.000 x g durante 10 minutos (YANG; WYMAN, 2004). As análises de glicose foram efetuadas sobre os sobrenadantes obtidos, empregando-se o kit de ensaio da glicose-oxidase.

A hidrólise foi realizada por Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), 2<sup>4</sup> fatorial: tempo, pH, temperatura e concentração da enzima, foram utilizados como as variáveis independentes (fatores), resultando em 27 combinações de tratamentos, sendo três amostras no ponto central. A corrida número 28 foi utilizada como validação externa para os modelos quadráticos gerados.

Para o sistema com quatro fatores, o modelo é dado pela seguinte equação polinomial de segunda ordem (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{44}x_4^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{14}x_1x_4 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{24}x_2x_4 + \beta_{34}x_3x_4 + \varepsilon \quad (2)$$

Onde Y é a resposta prevista;  $\beta_0$  representa a interseção;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$  são os coeficientes lineares,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$ ,  $\beta_{33}$  e  $\beta_{44}$  são os coeficientes quadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{14}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{24}$  e  $\beta_{34}$  são os coeficientes de interação e  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  e  $x_4$ , são as variáveis independentes de Tempo (T), pH,

Temperatura (Temp) e concentração da enzima (E), respectivamente. O termo  $\varepsilon$  representa o erro experimental.

Os valores codificados dos planejamentos de otimização e hidrólise foram calculados de acordo com a equação de regressão:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (3)$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado,  $X_i$  é o valor real,  $X_0$  é o valor real no ponto central e  $\Delta X_i$  é o valor de mudança de passo.

A análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta para os experimentos de otimização e hidrólise enzimática foram gerados pelo programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, USA).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Otimização da Produção da $\beta$ -Glicosidase Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Alguns dos principais fatores operacionais que afetam a produção enzimática por fungos são a concentração da fonte de carbono, o pH do meio de cultivo e tempo de cultivo. Desta forma, um planejamento fatorial  $2^3$  foi realizado, no intuito de estabelecer os parâmetros ótimos de produção de  $\beta$ -glicosidases em relação a esses fatores, bem como verificar as interações entre os mesmos, utilizando-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) realizada através de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

*T. viride* foi cultivado em presença de casca de maracujá e de farelo de canola, constituindo dois planejamentos experimentais, realizados separadamente. Os valores reais e codificados assim como os resultados obtidos nos dois planejamentos experimentais estão apresentados na Tabela 1, onde os tratamentos de 1 a 17 fazem parte do delineamento experimental, enquanto a corrida 18 refere-se à validação externa dos modelos.

De acordo com Tiwari et al. (2013), diversas espécies do gênero *Trichoderma* têm sido estudadas e relatadas por sua importância biotecnológica, sendo empregados na



sacarificação de materiais celulósicos, incluindo *T. viride*. No entanto, normalmente estas espécies produzem baixos níveis de  $\beta$ -glicosidases, destacando-se, desta forma, a importância de estabelecer os melhores parâmetros de produção destas enzimas, com o intuito de alcançar maiores índices de produtividade.

**Tabela 1.** Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de  $\beta$ -glicosidase por *T. viride*.

Corrida	Valores Reais (codificados)			$\beta$ -glicosidase (U mL <sup>-1</sup> )	
	Substrato (%)	Tempo (dias)	pH	Casca de Maracujá	Farelo de Canola
1	1,1 (-1)	4,4 (-1)	4,2 (-1)	0,20	0,36
2	2,9 (1)	4,4 (-1)	4,2 (-1)	0,29	0,91
3	1,1 (-1)	8,6 (1)	4,2 (-1)	0,50	0,74
4	2,9 (1)	8,6 (1)	4,2 (-1)	0,52	1,35
5	1,1 (-1)	4,4 (-1)	7,8 (1)	0,54	0,20
6	2,9 (1)	4,4 (-1)	7,8 (1)	1,23	0,48
7	1,1(-1)	8,6 (1)	7,8 (1)	0,36	0,31
8	2,9 (1)	8,6 (1)	7,8 (1)	0,99	0,57
9	0,5 (-1,68)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,18	0,21
10	3,5 (1,68)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,68	0,59
11	2,0 (0)	3,0 (-1,68)	6,0 (0)	0,14	0,29
12	2,0 (0)	10,0 (1,68)	6,0 (0)	0,19	0,55
13	2,0 (0)	6,5 (0)	3,0 (-1,68)	1,17	0,62
14	2,0 (0)	6,5 (0)	9,0(1,68)	0,72	0,33
15	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,37	0,59
16	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,36	0,61
17	2,0 (0)	6,5 (0)	6,0 (0)	0,37	0,61
18*	2,5	5,5	5,5	0,47	0,87

\* Valores referentes à validação.

A significância estatística foi verificada através do teste *F*. Os modelos foram altamente significativos ( $p < 0,05$ ), pois os valores de *F* calculado foram maiores do que os valores de *F* tabelado. A precisão de um modelo pode ser examinada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que neste caso foi de 0,7913 para *T. viride* em casca de maracujá e 0,8204 para *T. viride* em farelo de canola, indicando que 79,13% e 82,04% da variabilidade dos dados podem ser explicadas pelos modelos gerados. A análise de variância (ANOVA) para os modelos gerados está resumida na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para as  $\beta$ -glicosidasas produzidas por *T. viride* cultivado em casca de maracujá e farelo de canola, e os valores de  $R^2$  e F-valor.

Termos	$\beta$ -glicosidase – Casca de Maracujá						$\beta$ -glicosidase – Farelo de Canola					
	SQ	MQ	gl	F	F tab	F/Ftab	SQ	MQ	gl	F	F tab	F/Ftab
M	1,456	1,456	1	56,88	4,54	12,53	1,042	1,042	1	68,53	4,54	15,10
R	0,384	0,025	15	-	-	-	0,228	0,015	15	-	-	-
T	1,840	-	16	-	-	-	1,271	-	16	-	-	-
R <sup>2</sup>	0,7913						0,8204					

Termos	Coefficientes	p-valor	Coefficientes	p-valor
Média/Interc.	<b>0,362</b> ( $\pm 0,135$ )	<b>0,031</b>	<b>0,592</b> ( $\pm 0,104$ )	<b>0,001</b>
[S]	<b>0,166</b> ( $\pm 0,063$ )	<b>0,034</b>	<b>0,170</b> ( $\pm 0,049$ )	<b>0,010</b>
[S] <sup>2</sup>	0,035 ( $\pm 0,070$ )	0,632	-0,029 ( $\pm 0,054$ )	0,605
T	0,014 ( $\pm 0,063$ )	0,823	0,106 ( $\pm 0,049$ )	0,065
T <sup>2</sup>	-0,058 ( $\pm 0,070$ )	0,432	-0,021 ( $\pm 0,054$ )	0,701
pH	0,062 ( $\pm 0,063$ )	0,355	<b>-0,167</b> ( $\pm 0,049$ )	<b>0,011</b>
pH <sup>2</sup>	<b>0,218</b> ( $\pm 0,070$ )	<b>0,017</b>	-0,003 ( $\pm 0,054$ )	0,943
[S]xT	-0,016 ( $\pm 0,083$ )	0,852	0,006 ( $\pm 0,064$ )	0,917
[S]xpH	0,151 ( $\pm 0,083$ )	0,110	-0,078 ( $\pm 0,064$ )	0,260
TxpH	-0,118 ( $\pm 0,083$ )	0,195	-0,076 ( $\pm 0,064$ )	0,269

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; F: F calculado; F tab: F tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negritos são estatisticamente significativos. E os valores entre parênteses referem-se ao erro padrão.

A atividade enzimática foi tomada como a variável dependente ou resposta ( $\beta$ gli). Equações de segunda ordem foram ajustadas aos dados através da análise de regressão múltipla, resultando em modelos empíricos, que relatam as repostas medidas para as variáveis independentes (concentração do substrato, pH e tempo) do experimento. Para os sistemas com três fatores, considerando somente os termos significativos, foi gerada a equação 4 para o cultivo em casca de maracujá e equação 5 para o cultivo em farelo de canola.

$$\beta gli (Maracujá) = 0,362 + 0,166 S + 0,218 pH^2 \quad \text{Equação (4)}$$

$$\beta gli (Canola) = 0,592 + 0,170 S - 0,167 pH \quad \text{Equação (5)}$$

Onde  $\beta$ gli é a atividade de  $\beta$ -glicosidase, S é a concentração do substrato, T é o tempo e pH é o potencial hidrogeniônico.

Os coeficientes de regressão também estão apresentados na Tabela 2. A análise do  $p$ -valor é um instrumento útil para avaliar a significância dos coeficientes, de maneira que quanto menor o  $p$ -valor, maior a significância do coeficiente de variação correspondente. Nota-se que para *T. viride* cultivado em casca de maracujá, apenas o termo linear da variável independente concentração do substrato [S] e o termo quadrático do pH foram significativos.

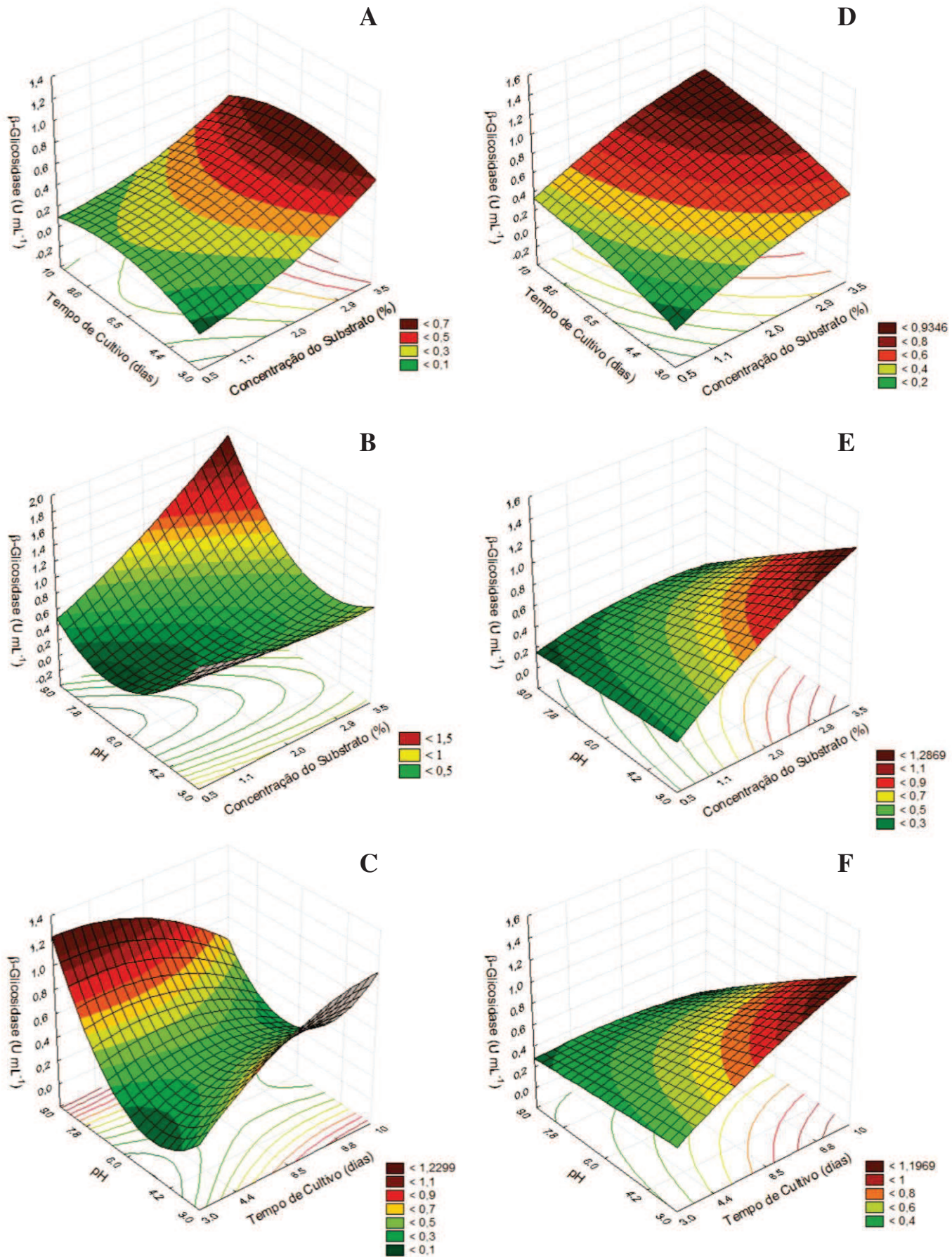
Já em relação a *T. viride* cultivado em farelo de canola, os termos lineares concentração do substrato [S] e pH foram significativos, enquanto que para os termos quadráticos nenhum foi significativo. Em relação às interações entre os termos, nenhuma interação foi significativa para o cultivo nos dois substratos.

Pode-se concluir que quando *T. viride* é cultivado em presença de casca de maracujá, a variável mais importante é o pH quadrático, seguida pela concentração do substrato [S] linear. Porém, quando *T. viride* é cultivado em presença de farelo de canola, a variável mais importante é a concentração do substrato [S] linear, seguida pelo pH linear. Observa-se que quando a concentração do substrato e o tempo de cultivo são aumentados e o valor de pH é diminuído, a produção de  $\beta$ -glicosidase aumenta, independente da fonte de carbono avaliada. As curvas de superfície de resposta para os fatores mais importantes que afetam a produção de  $\beta$ -glicosidase estão apresentados na Figura 1.

Adicionalmente, observa-se que diferentes condições de cultivo foram estabelecidas para cada substrato avaliado. As condições que proporcionaram maior produção de  $\beta$ -glicosidases com a utilização da casca de maracujá foram 2,9 % de concentração do substrato, pH 7,8 e tempo de incubação de 4,4 dias (corrida 6), correspondendo a  $1,23 \text{ U mL}^{-1}$ . Por outro lado, ao empregar o farelo de canola, os níveis de produção corresponderam a  $1,35 \text{ U mL}^{-1}$ , sendo as condições estabelecidas 2,9 % de concentração de substrato, pH 4,2 e tempo de 8,6 dias (corrida 4). Estas, por sua vez, foram diferentes das condições estabelecidas para distintas linhagens de *Aspergillus niger*. No trabalho de Azzaz et al. (2012) a produção máxima de celulasas correspondeu a  $0,097 \text{ U mL}^{-1}$ , sendo obtida por meio da utilização de 4 % de inóculo, durante três dias de incubação, em pH 6,0. Já nos estudos conduzidos por Akinyele e Olaniyi (2013), *A. niger* apresentou máxima produção de celulasas quando crescido em presença de 5% de concentração de substrato (casca de mamão), pH 4,5, por três dias.

Os valores de produção de  $1,23 \text{ U mL}^{-1}$  para casca de maracujá e  $1,35 \text{ U mL}^{-1}$  para farelo de canola não apresentam diferença estatística ( $< 0,05$ ). Em relação ao crescimento micelial, o mesmo padrão foi observado, onde o fungo em farelo de canola nas condições ótimas teve um crescimento correspondente a  $93,83 \text{ mg/mL}$  de proteína, enquanto que em casca de maracujá teve um crescimento correspondente a  $80,18 \text{ mg/mL}$  de proteína (dados não mostrados), não sendo estes valores diferentes ao nível de 5 % de significância. Apesar dos níveis de produção obtidos a partir de ambos os substratos serem similares, o emprego do farelo de canola apresenta-se vantajoso em relação à casca de maracujá, uma vez que a produção de enzimas empregando este resíduo como substrato ainda não foi reportada na literatura.

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos pelas altas taxas de produção de celulasas, porém geralmente produzem pequenas quantidades de  $\beta$ -glicosidases (TIWARI et al., 2013). Os níveis de produção de  $\beta$ -glicosidases obtidos neste estudo por *T.viride* são superiores aos observados em outros trabalhos. Uma linhagem de *Trichoderma harzianum* foi avaliada quanto ao seu potencial de produção, sendo esta correspondente a  $0,35 \text{ U mg}^{-1}$  (AHMED et al., 2009). Quando *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis* foram cultivados juntos em esterco uma produção de  $0,64 \text{ U mL}^{-1}$  foi verificada (WEN et al., 2005). Ainda, *Trichoderma lignorum* produziu apenas  $0,24 \text{ U mL}^{-1}$  em resíduo de banana (BAIG, 2005), enquanto que uma outra linhagem de *Trichoderma harzianum* apresentou uma produção de  $1,968 \text{ U mL}^{-1}$  em bagaço de cana (BENOLIEL et al., 2013).



**Figura 1.** Superfície de resposta para a produção de  $\beta$ -glicosidase. *T. viride* cultivado em casca de maracujá (A, B e C). *T. viride* cultivado em farelo de canola (D, E e F).



### 3.1.2 Validação do Modelo

A validação externa dos modelos para a otimização da produção das  $\beta$ -glicosidases foram realizadas nas seguintes condições: concentração do substrato 2,5%, tempo de cultivo 5,5 dias e pH 5,5 (corrida 18, Tabela 1). Os índices da atividade de  $\beta$ -glicosidase nesta corrida, para os experimentos com casca de maracujá e farelo de canola, foram utilizados para a modelagem a partir das equações quadráticas geradas pela Metodologia de Superfície de Resposta.

Para a casca de maracujá, o valor experimental da atividade  $\beta$ -glicosidase foi 0,47 U mL<sup>-1</sup>. Este valor foi comparado com a atividade proveniente da modelagem, a qual correspondeu a 0,45 U mL<sup>-1</sup>. Desta forma, a recuperação dos valores de  $\beta$ -glicosidase experimental em relação ao teor preditivo pelo modelo foi de 95,74%. Já para o farelo de canola, o valor experimental da atividade  $\beta$ -glicosidase foi 0,87 U mL<sup>-1</sup>. Quando este é comparado ao valor da atividade proveniente da modelagem (0,62 U mL<sup>-1</sup>), a recuperação dos valores de  $\beta$ -glicosidase experimental em relação ao teor preditivo pelo modelo foi de 71,26%.

Os altos valores destas porcentagens mostram as adequações aos modelos gerados, validando-os de forma satisfatória. Assim, o tratamento utilizado para a validação externa se adequou aos modelos gerados, indicando a robustez do delineamento proposto, bem como demonstra que a quimiometria aliada à modelagem matemática pode ser aplicada em estudos de atividades enzimáticas microbianas.

### 3.1.3 Simulação de Dados

No delineamento experimental (DCCR), seis modelos matemáticos foram gerados (Figura 1), sendo três para cada substrato. Entretanto, para a simulação, apenas quatro modelos foram utilizados, sendo estes os mais representativos dos experimentos deste estudo. Os modelos codificados permitiram a simulação de dados da produção de  $\beta$ -glicosidases, enquanto que os modelos gerados foram usados para executar as simulações da concentração do substrato e pH em relação ao tempo de cultivo (Figura 2).

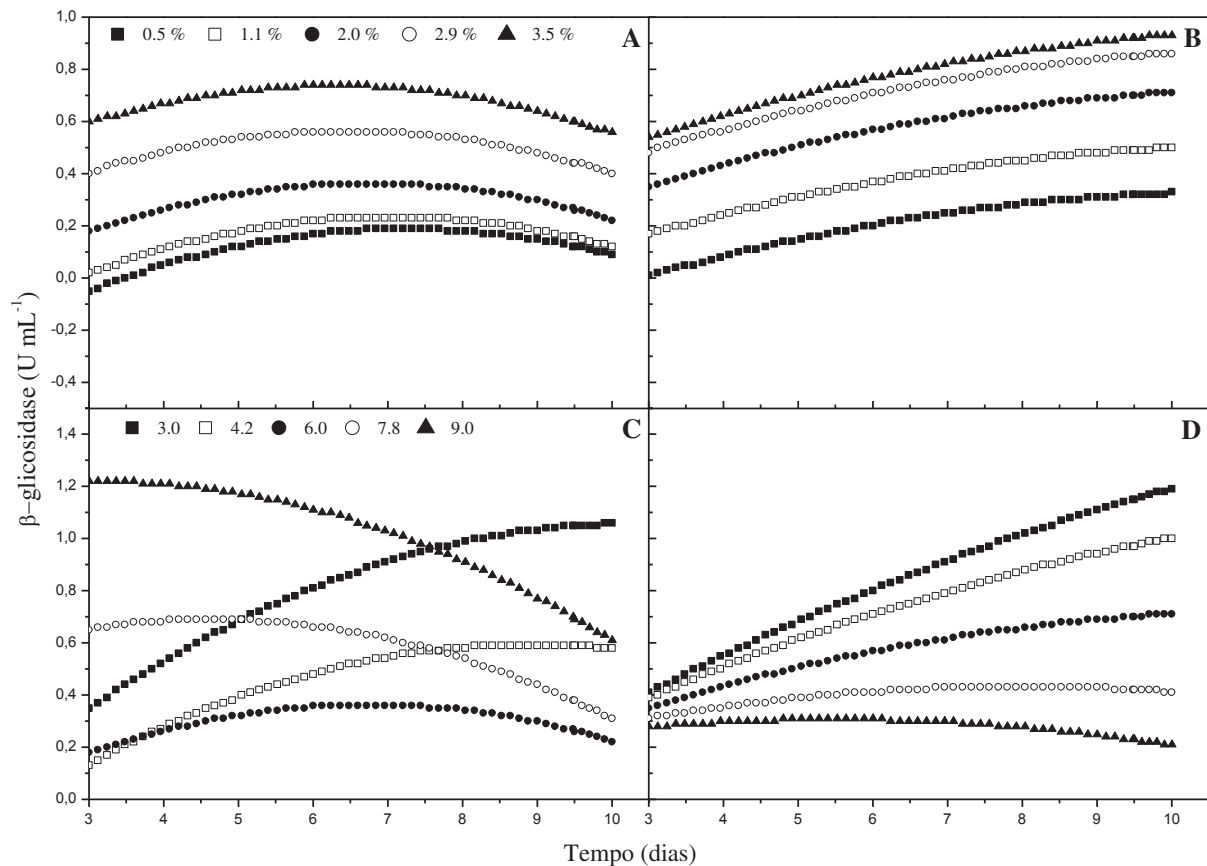
As principais vantagens da simulação e o motivo da sua aplicação em diversas áreas é sua simplicidade, realismo e flexibilidade (KLEIJNEN; STANDRIDGE, 1988). A simulação dos dados permite projetar o comportamento dos fatores analisados (concentração do substrato, pH e tempo) em relação a outro fator (como por exemplo, em relação ao

intervalo de tempo testado), enquanto o delineamento (DCCR) analisa pontos específicos, onde os fatores encontram-se combinados. Assim, a simulação complementa a análise dos dados do DCCR, a fim de melhor compreender os efeitos dos fatores e definir as melhores condições de cultivo, de tal forma que através do delineamento experimental e da análise de regressão possa ser utilizada para explicar a produção enzimática.

Na simulação da concentração do substrato em relação ao tempo de cultivo, pode-se observar que quanto maior a concentração do substrato, maior a produção de  $\beta$ -glicosidases, sendo 3,5% a melhor concentração de substrato estabelecida para a produção enzimática. Entretanto, a melhor concentração de substrato encontrado no DCCR para os dois substratos foi de 2,9 %. Uma vez que no DCCR as variáveis estão combinadas, pode-se concluir que a melhor concentração de substrato foi a de 3,5%.

Ao analisar a simulação os dados de pH de cultivo em relação ao tempo de cultivo, verifica-se que para casca de maracujá o melhor valor simulado de pH é 9,0, enquanto que no DCCR o valor de pH 7,8 propiciou a obtenção de maiores níveis de  $\beta$ -glicosidase. Para farelo de canola, o melhor valor de pH é 3,0 pela simulação, enquanto que no DCCR, o melhor valor foi 4,2. Constata-se, desta forma, que o fungo apresenta um comportamento diferente para os dois substratos, sendo que em casca de maracujá o pH básico é melhor, e para o farelo de canola o pH ácido favorece a produção enzimática.





**Figura 2.** Simulação de dados da atividade das  $\beta$ -glicosidases que demonstra a influência da concentração de substrato em relação ao tempo na atividade de  $\beta$ -glicosidase no cultivo de *T. viride* crescido em presença de: (A) casca de maracujá e (B) farelo de canola. Simulação de dados de pH iniciais do meio de cultivo em relação ao tempo de cultivo em *T. viride* crescido em presença de: (C) casca de maracujá e (D) farelo de canola.

## 3.2 Caracterização Enzimática

### 3.2.1 Efeito da Temperatura e do pH sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

A faixa de temperatura estabelecida como ótima para as  $\beta$ -glicosidases produzidas por *T. viride* foi 60-65 °C (Figura 3A), visto que estes dois valores de temperaturas não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância. A 35 °C e 80 °C a atividade decresceu drasticamente, observando-se valores inferiores a 10% da atividade relativa. Temperaturas ótimas semelhantes também foram encontradas para as  $\beta$ -glicosidases

de *Penicillium italicum* (PARK et al., 2012), *Trichoderma viride* (IRSHAD et al., 2013), *Penicillium pinophilum* (JOO et al., 2010) e *Aspergillus terreus* (ELSHAFEI et al., 2011), as quais apresentaram atividade máxima a 60 °C e as de *Penicillium sclerotiorum*, com temperatura ótima a 65°C (WEI et al., 2011).

As  $\beta$ -glicosidase de *T. viride* apresentaram maior atividade em pH 4,5 (Figura 3B) ao nível de significância de 5%. Este valor também foi encontrado para  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium italicum* (PARK et al., 2012). E para a  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium funiculosum*, a qual apresentou atividade máxima nos valores de pH entre 4,0-5,0 (RAMANI et al., 2012). Outras  $\beta$ -glicosidases fúngicas também apresentaram valores ótimos em pH ácido, como as de *Aspergillus niger* e as de *Penicillium simplicissimum*, com máxima atividade em pH 4,0 e 4,4-5,2, respectivamente (CHANG et al., 2012; BAI et al., 2013). Notadamente, as  $\beta$ -glicosidases de *Tolypocladium cylindrosporum* apresentaram atividade ótima em pH 2,4 (ZHANG et al., 2011). De acordo com Tiwari et al. (2013), as  $\beta$ -glicosidase geralmente possuem pH ótimo na faixa de 4,0-5,5. No entanto, atividades ótimas já foram observadas em valores de pH mais baixo, como 2,5 e alto, como 8,0 (TIWARI et al., 2013).

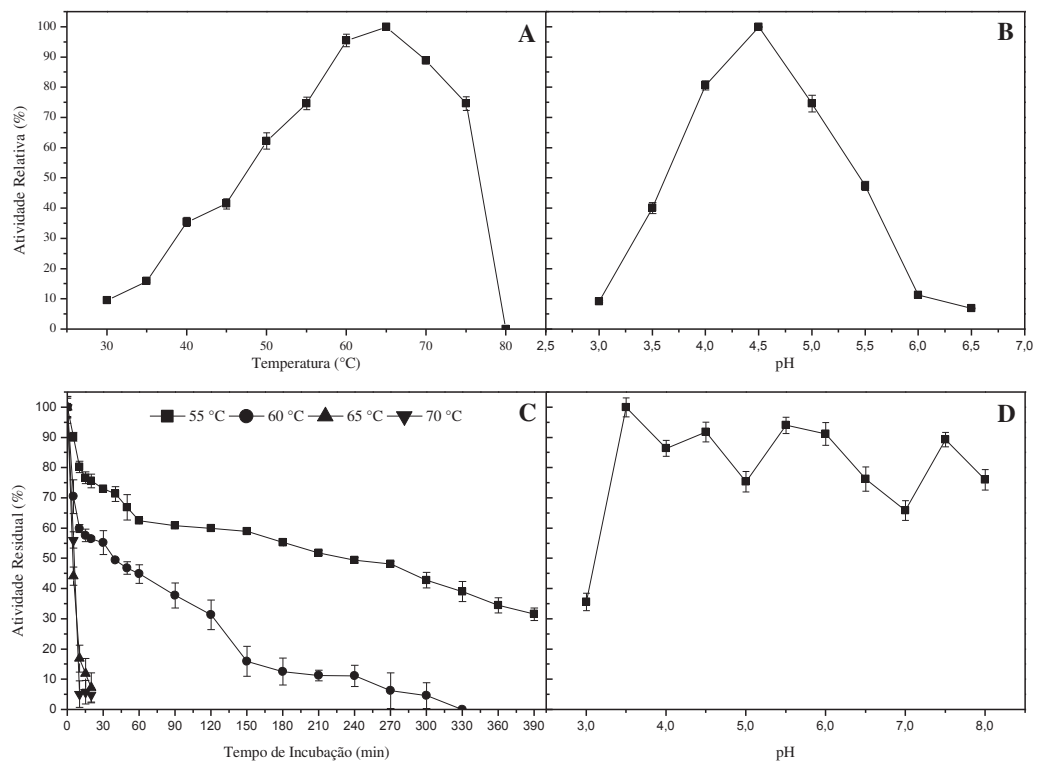
### 3.2.2 Estabilidade da $\beta$ -Glicosidase em Diferentes Temperaturas e Diferentes Valores de pH

Um das características mais importantes das  $\beta$ -glicosidases é sua termoestabilidade, a qual irá definir o seu potencial em aplicações industriais. Por esta razão, o extrato bruto de *T. viride* foi incubado a 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C, a fim de determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas.

A  $\beta$ -glicosidase de *T. viride* foi estável a 55 °C, apresentando meia vida ( $T_{1/2}$ ) de 210 min (Figura 3C). Nas temperaturas de 65 °C e 70°C, a estabilidade foi baixa, tendo a enzima sido desnaturada nos primeiros 15 minutos. As  $\beta$ -glicosidases de *T. viride* apresentaram-se mais estáveis termicamente do que outras  $\beta$ -glicosidases fúngicas como, por exemplo, as de *Aspergillus terreus* estáveis por 120 minutos a 50 °C (ELSHAFEI et al., 2011) e as de *Trichoderma reesei*, estáveis por 60 minutos a 50 °C (KOROTKOVA et al., 2009). De acordo com Tiwari et al. (2013) as  $\beta$ -glicosidases de fungos mesófilos são termoestáveis até 60 °C, sendo desnaturadas em temperaturas mais elevadas.

Adicionalmente, as enzimas de *T. viride* apresentaram boa estabilidade em uma ampla faixa de pH de 3,5-8,0, sendo que os menores valores foram verificados em pH 3,0 e

7,0 correspondendo a 35,71% e 65,05% de atividade residual, respectivamente. Nos demais valores de pH a atividade residual ficou acima de 70% (Figura 3D). Característica semelhante foi encontrada para as  $\beta$ -glicosidases provenientes de outra linhagem de *T. viride*, porém estas se mostram estáveis em uma faixa mais estreita (pH 4,0-7,0) (IRSHAD et al., 2013) e para as  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium funiculosum*, que foram estáveis em uma faixa de pH de 3,0-6,0 (RAMANI et al., 2012).



**Figura 3.** Influência da temperatura (A), pH (B) e estabilidade térmica (C) e estabilidade de pH (D) na atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*. Figura A ( $p < 0,01$ ), figuras B e D ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Efeito de Íons Metálicos e Outras Substâncias sobre a Atividade da $\beta$ -Glicosidase

O extrato bruto de *T. viride* foi incubado na presença de diferentes substâncias e íons metálicos, nas concentrações de 2 e 10 mM (Tabela 3), com o intuito de estabelecer possíveis ativadores e inibidores da atividade  $\beta$ -glicosidásica. Os dados foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5% pela análise de variância (ANOVA), sendo o

teste de Tukey aplicado para verificar diferença estatística entre as médias dos valores das respectivas atividades de  $\beta$ -glicosidase.

A ativação da  $\beta$ -glicosidase foi observada em presença de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\beta$ -mercaptoetanol na concentração de 2 mM. De forma similar, as  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium simplicissimum* (BAI et al., 2013) e de *Penicillium verrucosum* (BHOITE et al., 2013) foram ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que a  $\beta$ -glicosidase de *Scytalidium thermophilum* foi ativada por  $\beta$ -mercaptoetanol (SILVA et al., 2013). A ativação por esta última substância indica possivelmente que grupos sulfidrilas estão presentes no sítio ativo destas enzimas, prevenindo, desta forma, a oxidação dos mesmos. Adicionalmente, o  $\text{Pb}^{+2}$  também foi capaz de ativar as  $\beta$ -glicosidases de *T. viride* na concentração de 10 mM, comportamento este também observado em  $\beta$ -glicosidases de *Aspergillus fumigatus* (LIU et al., 2012) e de um isolado bacteriano (BAJAJ et al., 2009).

Forte inibição da atividade  $\beta$ -glicosidásica foi constatada na presença de SDS e  $\text{Mn}^{+2}$ , enquanto inibição moderada foi verificada na presença de  $\text{Ba}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$ . A inibição por SDS sugere a importância das ligações hidrofóbicas na manutenção da estrutura da enzima.

**Tabela 3.** Efeito de diferentes substâncias na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

Substâncias	Concentração	
	2 mM	10 mM
Control	100,00 $\pm$ 2,06 <sup>c</sup>	100,00 $\pm$ 2,06 <sup>c</sup>
CuSO <sub>4</sub>	80,56 $\pm$ 2,65 <sup>cd</sup>	74,23 $\pm$ 0,99 <sup>d</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	89,40 $\pm$ 1,60 <sup>bg</sup>	83,16 $\pm$ 4,39 <sup>bc</sup>
MnSO <sub>4</sub>	34,98 $\pm$ 3,77 <sup>h</sup>	22,35 $\pm$ 2,97 <sup>h</sup>
BaCl <sub>2</sub>	74,88 $\pm$ 1,91 <sup>d</sup>	93,67 $\pm$ 5,04 <sup>ae</sup>
CaCl <sub>2</sub>	110,42 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>	90,23 $\pm$ 0,89 <sup>ab</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	99,91 $\pm$ 0,28 <sup>e</sup>	84,84 $\pm$ 4,57 <sup>bcg</sup>
NaCl	87,16 $\pm$ 2,97 <sup>bef</sup>	86,23 $\pm$ 1,62 <sup>ac</sup>
SDS	18,14 $\pm$ 4,81 <sup>i</sup>	6,89 $\pm$ 4,02 <sup>j</sup>
MgSO <sub>4</sub>	95,72 $\pm$ 3,81 <sup>eg</sup>	86,60 $\pm$ 1,59 <sup>ac</sup>
Citrato de Sódio	83,72 $\pm$ 3,28 <sup>bc</sup>	82,14 $\pm$ 3,42 <sup>c</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	76,19 $\pm$ 1,60 <sup>d</sup>	73,77 $\pm$ 3,88 <sup>d</sup>
HgCl <sub>2</sub>	80,56 $\pm$ 2,00 <sup>cd</sup>	62,98 $\pm$ 4,86 <sup>f</sup>
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	90,69 $\pm$ 4,07 <sup>fg</sup>	111,81 $\pm$ 3,12 <sup>i</sup>
EDTA	89,58 $\pm$ 0,31 <sup>bef</sup>	87,26 $\pm$ 1,21 <sup>ac</sup>
$\beta$ -mercaptoetanol	107,44 $\pm$ 3,43 <sup>a</sup>	92,19 $\pm$ 0,17 <sup>ag</sup>

Letras iguais denotam que não há diferença estatística significativa, letras diferentes denotam que há diferença estatística significativa entre as espécies químicas analisadas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.4 Tolerância a Glicose

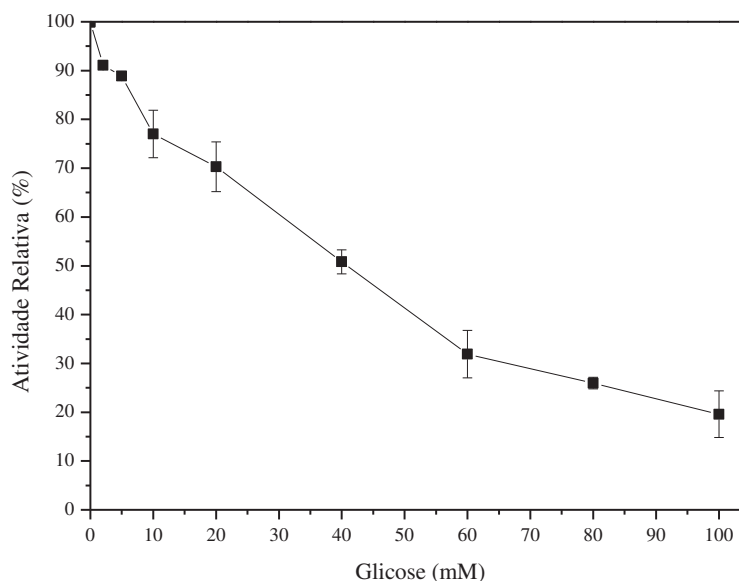
A inibição da  $\beta$ -glicosidase por glicose desempenha um papel negativo na hidrólise enzimática, culminando na redução significativa da taxa de conversão da celulose (SØRESEN et al., 2013). Desta forma, a sensibilidade à glicose é um fator importante a ser avaliado, visto que enzimas tolerantes a altas concentrações de glicose são mais eficientes na sacarificação de materiais lignocelulósicos.

Por meio da realização do experimento de tolerância à glicose (Figura 4), constata-se que quando a concentração de glicose aumenta, a atividade  $\beta$ -glicosidásica diminui gradativamente, evidenciando a sua inibição pelo aumento da concentração de glicose. O  $K_i$  da  $\beta$ -glicosidase de *T. viride* foi calculado através da regressão de probitos ( $p < 0,01$ ), obtendo-se um  $K_i$  previsto de 50,33 mM, com  $R = 0,9984$ ,  $R^2 = 0,9968$  e  $R^2$  ajustado = 0,9966. A análise de probitos gerou a seguinte equação de regressão:

$$\text{Atividade Relativa \%} = 0,0971 + 0,008 x \quad (7)$$

Onde  $x$  é a concentração de glicose (mM).

O valor  $K_i$  de 50,33 mM é expressivo quando comparado com o  $K_i$  apresentado por outras  $\beta$ -glicosidases fúngicas, tais como as de *Aspergillus japonicus* com  $K_i$  de 2,73 mM (KOROTKOVA et al., 2009), de *Aspergillus terreus* com  $K_i$  de 13,6 mM (ELSHAFEI et al., 2011), *Tolyocladium cylindrosporum* com  $K_i$  de 39,5 mM (ZHANG et al., 2011) e as de *Piptoporus betulinus*, as quais apresentaram um  $K_i$  de 5,8 mM (VALÁSKOVÁ; BALDRIAN, 2006). Valores de  $K_i$  consideravelmente inferiores foram observados para as  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma reesei* (0,51 mM) (KARNAOURI et al., 2013) e de um recombinante de *Myceliophthora thermophila* (0,282 mM). Por apresentar maior tolerância à glicose, em decorrência do maior valor de  $K_i$  encontrado, o emprego das  $\beta$ -glicosidase de *T. viride* nos processos de sacarificação enzimática pode ser vantajoso frente o uso de muitas  $\beta$ -glicosidases reportadas na literatura.



**Figura. 4.** Efeito da concentração de glicose na atividade da  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

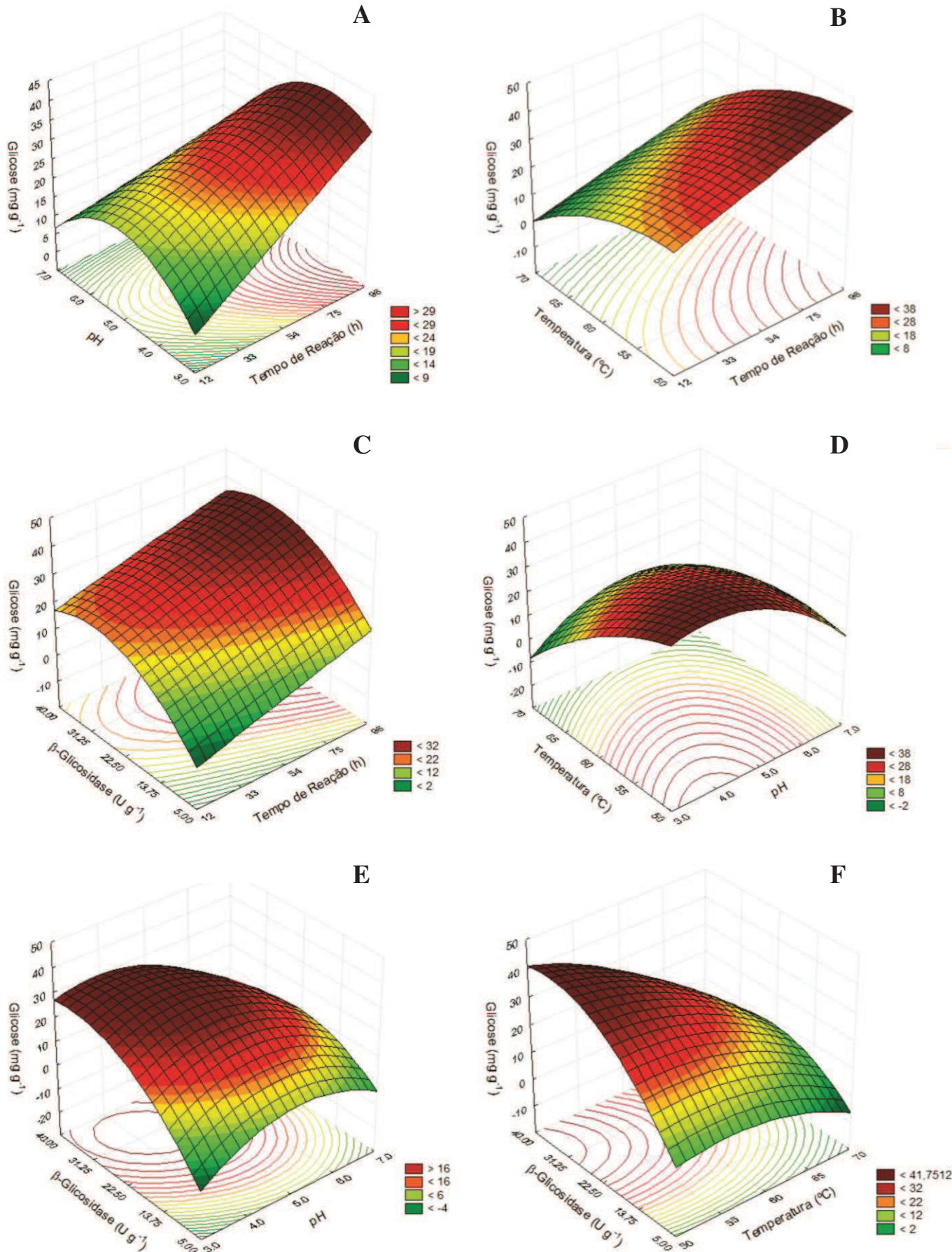
### 3.3 Hidrólise Enzimática

O Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), foi empregado para avaliar os principais efeitos e interações do tempo, pH, temperatura e concentração da enzima, na liberação de glicose a partir da casca de maracujá pré-tratada pelo método alcalino.

Os gráficos de superfície de resposta estão apresentados na Figura 5 e mostram os efeitos dos fatores tempo, pH, temperatura e concentração da enzima na hidrólise enzimática da casca de maracujá, bem como determinam os pontos ótimos para cada variável para a máxima reposta de glicose liberada.

Os modelos experimentais e resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4, sendo as corridas de 1 a 27 pertencentes ao planejamento experimental, enquanto a corrida 28 refere-se à validação do modelo. As variáveis independentes foram tempo de hidrólise (dias), pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração da enzima ( $\text{U g}^{-1}$ ), e a variável dependente foi taxa de liberação de glicose ( $\text{mg/g}$  de substrato).





**Figura 5.** Superfície de resposta para liberação de glicose em função do pH e tempo (A); Temperatura x Tempo (B); Enzima x Tempo (C); Temperatura x pH (D); Enzima x pH (E) e Enzima x Temperatura (F), para hidrólise enzimática de casca de maracujá com extrato bruto de *T. viride*.



**Tabela 4.** Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para hidrólise enzimática da casca de maracujá com liberação de glicose.

Corrida	Valores Reais (codificados)				Resposta
	Tempo (h)	pH	Temperatura (°C)	Enzima (U g <sup>-1</sup> )	Glicose (mg/g de substrato)
1	33 (-1)	4,0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	22,35
2	33 (-1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25(1)	37,99
3	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	5,69
4	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,25(1)	13,08
5	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	10,46
6	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25(1)	20,80
7	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	13,48
8	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25(1)	10,60
9	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	27,05
10	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25(1)	43,03
11	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	17,51
12	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,251 (1)	24,70
13	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	20,60
14	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25 (1)	23,89
15	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	8,65
16	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25 (1)	11,07
17	12 (-2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	11,94
18	96 (-2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	47,13
19	54 (0)	3,0 (-2)	60 (0)	22,50 (0)	15,16
20	54 (0)	7,0 (2)	60 (0)	22,50 (0)	18,92
21	54 (0)	5,0 (0)	50 (-2)	22,50 (0)	38,40
22	54 (0)	5,0 (0)	70 (2)	22,50 (0)	8,51
23	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	5,00 (-2)	1,80
24	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	40,00 (2)	33,02
25	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	28,93
26	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	27,45
27	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	28,12
28*	45	4,50	58	18,00	25,97

\* Valores referentes à validação do modelo.

A eficácia do modelo e a capacidade de explicação dos dados experimentais foi averiguada pelo coeficiente de determinação  $R^2$  que foi de 0,8710, indicando que 87,10 % da variabilidade dos dados pode ser explicada por este modelo, sugerindo uma representação satisfatória do modelo do processo de hidrólise. Aplicando-se o teste  $F$ , verifica-se que o modelo foi preditivo, pois o valor de  $F$  calculado para a regressão foi maior do que o valor de  $F$  tabelado. Portanto, o modelo foi significativo ao nível de 5 %. A análise de variância (ANOVA) para o modelo está resumida na Tabela 5.

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir de casca de maracujá hidrolisada por extrato bruto de *T. viride*, e os valores de R<sup>2</sup> e F-valor.

Glicose						
Termos	SQ	MQ	gl	F	F tab	F/Ftab
M	3030,282	1515,141	2	63,77	3,40	18,76
R	570,190	23,758	24	-	-	-
T	3600,472	-				
R <sup>2</sup>	0,8416					

Termos	Coefficientes	p-valor
Média/Interc.	<b>28,167(3,980)</b>	<b>0,000</b>
T	<b>4,684 (1,407)</b>	<b>0,006</b>
T <sup>2</sup>	-0,063 (1,492)	0,967
pH	-2,680 (1,407)	0,081
pH <sup>2</sup>	-3,185 (1,492)	0,054
Temp	<b>-6,715 (1,407)</b>	<b>0,000</b>
Temp <sup>2</sup>	-1,582 (1,492)	0,310
E	<b>5,075 (1,407)</b>	<b>0,004</b>
E <sup>2</sup>	-3,093 (1,492)	0,060
T x pH	-1,519 (1,723)	0,395
T x Temp	-0,243(1,723)	0,890
T x E	-0,101 (1,723)	0,954
pH x Temp	2,342 (1,723)	0,199
pH x E	-2,065 (1,723)	0,254
Temp x E	-1,947 (1,723)	0,281

M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; F: F calculado; F tab: F tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negritos são estatisticamente significativos. E os valores entre parênteses referem-se ao erro padrão.

A equação de regressão polinomial de segunda ordem foi utilizada para avaliar os dados de liberação de glicose quando a casca de maracujá foi hidrolisada pelo extrato bruto de *T. viride*, o modelo foi simplificado pela eliminação dos termos não significativos, (Equação 6).

$$Gli = 28,167 + 4,684 T - 6,715 Temp + 5,075 E \quad \text{Equação (6)}$$

Onde Gli é a concentração de glicose, T é tempo, Temp é temperatura, pH é potencial hidrogeniônico e E é a concentração da enzima.

O rendimento mínimo e máximo de glicose foi de 1,80 mg/g e 47,13 mg/g de substrato, respectivamente. Os coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 4. Por meio da análise do p-valor, verifica-se a significância de cada coeficiente, pois quanto menor o p-valor, mais significativo é o coeficiente correspondente. Assim observa-se que os três termos lineares das variáveis independentes, tempo, temperatura e concentração da enzima foram significativos, enquanto que seus efeitos quadráticos e de interação não foram significativos. Desta forma, pode-se concluir que para a hidrólise de casca de maracujá com o

extrato enzimático bruto de *T. viride*, a variável mais importante é a temperatura linear, concentração da enzima linear, seguida pelo tempo linear, sendo que quando a temperatura e o pH são diminuídos e o tempo e a concentração da enzima é aumentada, a taxa de hidrólise é favorecida.

As condições de hidrólise enzimática onde houve maior taxa de conversão a glicose foram 96 horas de incubação, pH 5,0, temperatura de 60 °C e concentração da enzima de 22,50 U g<sup>-1</sup> (corrida 18). Nestas condições, a quantidade de glicose obtida correspondeu a 47,13 mg/g de substrato ou 9,43 g/L. A taxa de conversão da casca de maracujá em glicose foi de 66,4 %.

Os valores de glicose obtidos neste estudo são superiores a outros relatados, tais como os obtidos por Zhao et al. (2013), que ao utilizar extrato bruto de *T. viride*, obtiveram 14,66 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores a partir de talo de milho. Ao empregar celulases comerciais para a hidrólise da cana-de-açúcar, Sindhu et al. (2011) verificaram a liberação de 0,685 g/g de açúcares redutores. Estudos conduzidos por Dashtban e Qin (2012) obtiveram 1,92 g/L de glicose a partir da hidrólise de palha de cevada, empregando-se o extrato bruto de *Trichoderma reesei* e 8,16 g/L de açúcares redutores e 4,48 g/L de glicose a partir da hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com extrato bruto de *Trichoderma harzianum* (BENOLIEL et al., 2013).

Em relação às condições de hidrólise, parâmetros semelhantes foram estabelecidos por Harnpicharnchai et al. (2009), onde máxima taxa de conversão foi verificada após 96 horas, a 60 °C e pH 6,0, durante a hidrólise da casca de arroz, por  $\beta$ -glicosidases de *Periconia* sp., obtendo-se 16 mg de açúcares redutores/g de substrato.

### 3.3.1 Validação do Modelo

Para confirmar a aplicabilidade do modelo relacionado à hidrólise da casca de maracujá pelo extrato bruto de *T. viride*, a validação externa foi realizada nas seguintes condições: tempo de hidrólise 45 horas, pH 4,5, temperatura 58 °C e concentração da enzima de 18 U g<sup>-1</sup> (corrida 28 da Tabela 3). O índice de glicose obtida nesta corrida foi utilizado para a modelagem a partir da equação quadrática gerada pela metodologia de superfície de resposta.

O valor de glicose liberada no experimento foi de 25,97 mg/g de substrato, enquanto que a produção proveniente da modelagem correspondeu a 25,28 U mL<sup>-1</sup>. Desta forma, a

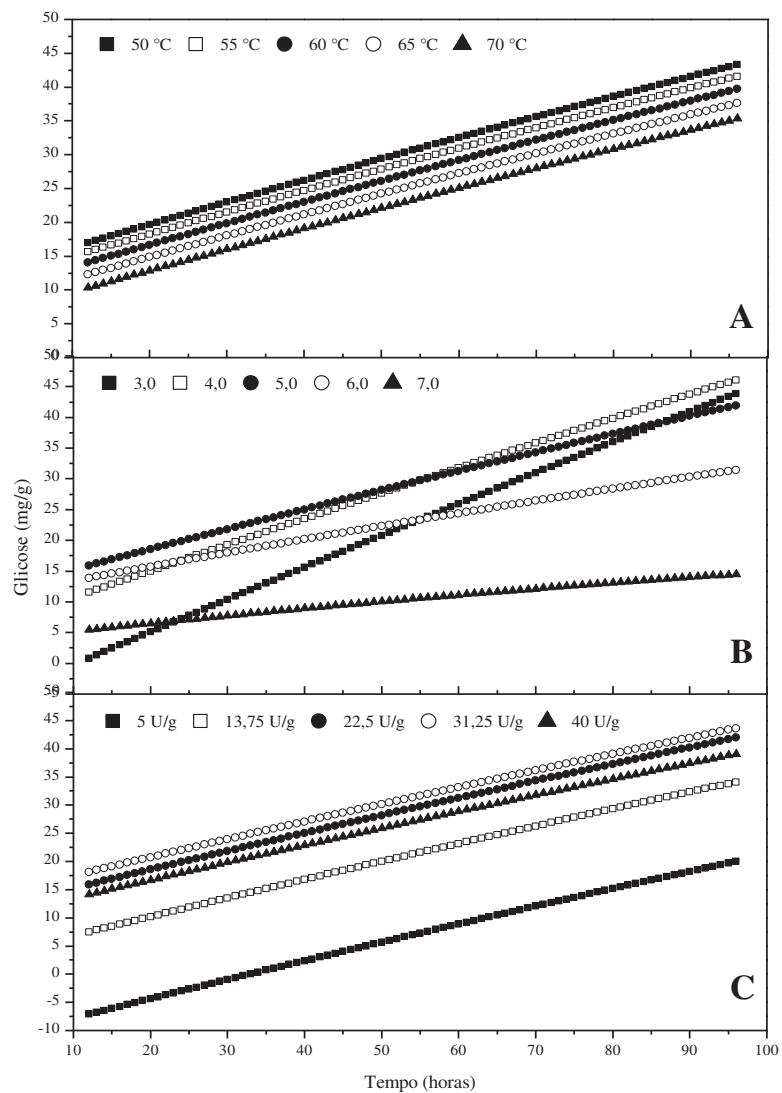
recuperação da modelagem foi de 97,33%. Este alto valor demonstra a adequação ao modelo gerado, validando-o de forma satisfatória.

### 3.3.2 Simulação de Dados

Seis modelos foram gerados, no entanto, para a simulação foram utilizados apenas três modelos, os quais melhor representam os experimentos deste estudo. O modelo codificado permitiu a simulação de dados da concentração de glicose, enquanto que o modelo gerado foi usado para executar as simulações da temperatura, pH e concentração da enzima em relação ao tempo de hidrólise (Figura 6).

O delineamento experimental expõe as condições otimizadas baseadas nos níveis escolhidos, porém, isto não significa que cada variável independente escolhida é a melhor (AKALIN et al., 2013). Assim os resultados de simulação veem a somar para uma melhor interpretação dos dados.

Para a simulação da temperatura em relação ao tempo, pode-se observar que quanto menor a temperatura, maior a concentração de glicose liberada. Verifica-se que no tempo de 96 horas, a melhor temperatura de hidrólise ficou em 50 °C, o mesmo encontrado no DCCR. Para a simulação do pH em relação ao tempo, o melhor valor de pH foi 4,0, diferente do encontrado no DCCR, cujo valor foi 5,0. Para a simulação da concentração da enzima em relação ao tempo, a melhor concentração estabelecida foi de 31,25 U g<sup>-1</sup>, enquanto que no DCCR foi de 22,50 U g<sup>-1</sup>.



**Figura. 6.** Simulação de dados da concentração de glicose, que demonstra a influência da temperatura (A), pH (B) e concentração da enzima (C) em relação ao tempo de hidrólise da casca de maracujá pelo extrato bruto de *T. viride*.

#### 4. Conclusões

Muitos estudos relacionados à produção de  $\beta$ -glicosidases vêm sendo conduzidos nos últimos anos, porém, poucos envolvem a otimização dos processos de produção e hidrólise enzimática por meio da Metodologia de Superfície de Resposta e simulação. Neste trabalho, foi possível verificar que estas ferramentas foram eficazes em estabelecer as condições ótimas de produção de  $\beta$ -glicosidase, bem como as de hidrólise enzimática de casca de maracujá. A máxima produção de  $\beta$ -glicosidase obtida empregando-se o farelo de canola como substrato correspondeu a  $1,35 \text{ U mL}^{-1}$ , enquanto que os maiores níveis de glicose observados a partir da hidrólise da casca de maracujá foram de  $9,43 \text{ g L}^{-1}$ . Estes resultados sugerem que a produção de  $\beta$ -glicosidases a partir do farelo de canola, bem como a sacarificação da casca de maracujá por estas enzimas são promissoras, visto que estes resíduos são encontrados a baixo custo e gerados em grandes quantidades no Brasil. Adicionalmente, as características bioquímicas apresentadas pelas  $\beta$ -glicosidases de *T. viride* como estabilidade frente à temperatura e em ampla faixa de pH, bem como tolerância à glicose as tornam particularmente interessantes do ponto de vista industrial, especialmente para serem empregadas na hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais.

## 5. Referências Bibliográficas

ADSUL, M.G.; SINGHVI, M.S.; GAIKAIWARI, S.A.; GOKHALE D.V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4304–4312, 2011.

AHMED, S.; BASHIR, A.; SALEEM, H.; SAADIA, M.; JAMIL, A. Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.

AKALIN, M.K.; KARAGÖZA S.; AKYÜZBA, M. Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 164–172, 2013.

AKINYELE, J.B.; OLANIYI, O.O. Investigation of the cellulases production by *Aspergillus niger* NSPR 002 in different cultivation conditions. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 13, p. 71-79, 2013.

AZZAZ, H.H., MURAD, H.A., KHOLIF, A.M., HANFY, M.A., GAWAD, A.M.H. Optimization of culture conditions affecting fungal cellulase production. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 23-31, 2012.

BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y.; HAN, X.; YANG, Q. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 528-540, 2013.

BAIG, M.M.V. Cellulolytic enzymes of *Trichoderma lignorum* produced on banana agro-waste: optimization of culture medium and conditions. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 57-60, 2005.

BAJAJ, B.K; PANGOTRA, H.; WANI, M.A.; SHARMA, A.; SHARMA, P. Characterization of thermo-tolerant and acid/alkali tolerant  $\beta$ -glucosidase from bacterial isolate M+. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 68, p. 242-247, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. 401p.

BENOLIEL, B.; TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M.P. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **Springer Plus**, v. 2, p. 656, 2013.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 2-19, 2012.

BHOITE, R. N.; NAVYA, P.N.; MURTHY P. Statistical optimization, partial purification, and characterization of coffee pulp  $\beta$ -glucosidase and its application in ethanol production. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 205-212, 2013.



CHANG, K.H.; JO, M.N.; KIM, K.T.; PAIK, H.D. purification and characterization of a ginsenoside rb1-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 12140-12152, 2012.

DASHTBAN, M.; QIN, W. Overexpression of an exotic thermotolerant  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei* and its significant increase in cellulolytic activity and saccharification of barley straw. **Microbial Cell Factories**, v.11, n. 63, p. 1-15, 2012.

ELSHAFEI, A.M.; HASSAN, M.M.; MORSI, N.M.; ELGHONAMY, D.H. Purification and some kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus terreus* NRRL 265. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 84, p. 19556-19569, 2011.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 3, p. 61–69, 2009.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; RAMZAN, M.; MAHMOOD, Z.; NAWAZ, H. Characterization of purified  $\beta$ -glucosidase produced from *Trichoderma viride* through bio-processing of orange peel waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 941-944, 2013.

JOO, A.R.; JEYA, M.; LEE, K.M.; LEE, K.M.; MOONA, H.J.; KIM, Y.S.; LEE, J.K. Production and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 851–858, 2010.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; PASCHOS, T.; TAOUKI, I.; CHRISTAKOPOULO, P.S. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **PeerJ**, p. 1-20, 2013.

KLEIJNEN, J.P.C.; STANDRIDGE, C.R. Experimental design and regression analysis in simulation: An FMS case study. **European Journal of Operational Research**, v. 33, v. 3, p. 257-261, 1988.

KOROTKOVA, O.G.; SEMENOVA, M.V.; MOROZOVA; V.V.; ZOROV, I.N.; SOKOLOVA, L.M.; BUBNOVA, T.M.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of fungal  $\beta$ -Glucosidases. **Biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 569-577, 2009.

LIU, D.; ZHANG R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X3. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 25, 2012.

MEYER, A.S.; ROSGAARD, L.; SØRENSEN, H.R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 337-344, 2009.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.

PARK, A.R.; HONG, J.H.; KIM, J.J.; YOON, J.J. Biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, isolated from rotten citrus peel. **Mycobiology**, v. 40, n. 3, p.173-180, 2012.

PEI, J.; PANG, Q.; ZHAO, L.; FAN, S.; SHI, H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*  $\beta$ -glucosidase: A glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2012.

RAMANI, G.; MEERA, B.; VANITHA, C.; RAO, M.; GUNASEKARAN, P. Production, purification, and characterization of a  $\beta$ -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 959–972, 2012.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SEDMAK J.J.; GROSSBERG S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.

SILVA, J.C.R.; GUIMARÃES, L.H.S.; SALGADO, J.C.S.; FURRIEL, R.P.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; ROSA, J.C.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of glucose-cellobiose-tolerant cellulases from *Scytalidium thermophilum*. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 561–568, 2013.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10915–10921, 2011.

SØRENSEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; AHRING, B.K. Fungal Beta-Glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612-631, 2013.

SWEENEY, M.D.; XU, F. Biomass Converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, v. 2, p. 244-263, 2012.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S.  $\beta$ -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

VALÁSKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology**, v. 152, p. 3613–3622, 2006.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.

WEI, Y.; ZHAO, W.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Purification and characterization of a novel and unique ginsenoside Rg1-hydrolyzing  $\beta$ -D-Glucosidase from *Penicillium sclerotiorum*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, n. 3, p. 226–231, 2011.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3087–3094, 2005.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, n. 86, p. 88-95, 2004.

ZHANG, P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452- 481, 2006.

ZHANG Y.B., YUAN, L.J.; CHEN, Z.J.; FU, L.; LU, J.H.; MENG, Q.F., HE, H.; YU, X.X.; LIN, F.; TENG, L.R. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from a newly isolated strain *Tolypocladium cylindrosporum* Syzx4. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 27, n. 4, p. 557-561, 2011.

ZHAO, L.; CAO, G.L.; WANG, A.J.I.E.; REN, H.Y.; XU, C.J.; REN, N.Q. Enzymatic saccharification of cornstalk by onsite cellulases produced by *Trichoderma viride* for enhanced biohydrogen production. **GCB Bioenergy**, v. 5, n. 5, p. 591–598, 2013.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio deste estudo, verifica-se que *P. verruculosum* foi capaz de produzir altos níveis de  $\beta$ -glicosidases quando crescido em casca de maracujá, obtendo-se uma produção 5,73 vezes superior a observada inicialmente, correspondendo a  $8,54 \text{ U mL}^{-1}$  sob condições otimizadas. *T. viride* também foi capaz de produzir  $\beta$ -glicosidases em presença desta fonte de carbono, porém em níveis inferiores, correspondendo a  $1,23 \text{ U mL}^{-1}$ . Níveis similares de  $\beta$ -glicosidases foram produzidos por este fungo quando crescido em farelo de canola, correspondendo a  $1,35 \text{ U mL}^{-1}$ .

Em relação aos experimentos de hidrólise enzimática, o extrato bruto de *T. viride* demonstrou maior eficiência em converter a casca de maracujá em glicose, apresentando uma taxa de conversão de 66,4 %, enquanto que a taxa de conversão em glicose deste mesmo substrato obtida por meio da aplicação do extrato bruto de *P. verruculosum* correspondeu a 45,07 %.

As  $\beta$ -glicosidases produzidas por *P. verruculosum* e *T. viride* exibiram características bioquímicas interessantes, como boa estabilidade frente à temperatura e a uma ampla faixa de pH, bem como alta tolerância a glicose, onde um  $K_i$  de 51,70 mM e de 50,33 mM foi verificado, respectivamente. Adicionalmente, as  $\beta$ -glicosidases de *P. verruculosum* foram ativadas por  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e citrato de sódio, enquanto que as enzimas provenientes de *T. viride* foram ativadas por  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  e  $\beta$ -mercaptoetanol. Por sua vez, as propriedades bioquímicas exibidas pelas  $\beta$ -glicosidases de ambas as linhagens fúngicas tornam sua aplicação interessante em processos industriais, especialmente na sacarificação da biomassa, uma vez que a tolerância à glicose é uma característica imprescindível para este tipo de aplicação.

Por fim, o emprego da casca de maracujá para a produção de  $\beta$ -glicosidases e como matéria-prima de baixo custo nos processos de sacarificação, além de possibilitar a obtenção de níveis elevados destas enzimas e de glicose, pode contribuir para a diminuição dos custos de produção enzimática, bem como evitar problemas ambientais em decorrência de sua deposição inadequada no ambiente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.G.; SINGHVI, M.S.; GAIKAIWARI, S.A.; GOKHALE D.V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4304–4312, 2011.

AGRAWAL, R.; SATLEWAL, A.; VERMA, A.K. Development of a  $\beta$ -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 381–388, 2013.

AHMED, S.A.; EL-SHAYEB, N.M.A.; HASHEM, A.G.M.; SALEH, S.A.; ABDEL-FATTAH, A.F. Enhancement of  $\beta$ -glucosidase production by free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1 Cells. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 2311-2321, 2013.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

BALAN, V.; ROGERS, C.A.; CHUNDAWAT, S.P.S.; SOUSA, L.C.; SLININGER, P.J.; GUPTA, R.; DALE, B.E. Conversion of extracted oil cake fibers into bioethanol including ddgs, canola, sunflower, sesame, soy, and peanut for integrated biodiesel processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 157–165, 2009.

BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 1. ed. 2009, 341 p.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 2-19, 2012.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.

BHOITE, R.N.; NAVYA, P.N.; MURTHY, P. Statistical optimization, partial purification, and characterization of coffee pulp  $\beta$ -glucosidase and its application in ethanol production. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 205-212, 2013.

BIORESOURCE COLLECTION AND RESERCH CENTER. Disponível em: <[http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal\\_detail.jsp?id=FU200802270019](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802270019),> Acesso em: 11 jan 2014.

BRADLEY, N. **The response surface methodology**. 2007, 84 f. Dissertação (Master of Science in Applied Mathematics & Computer Science) - Indiana University of South Bend, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

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

BOX, G.B.P.; WILSON, K.B. On experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1-45, 1951.

CASTRO, S.M.; CASTRO, A.M. Assessment of the Brazilian potential for the production of Enzymes for biofuels from agroindustrial materials. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 2, p. 87–107, 2012.

CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N.L. Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-8, 2010.

CHENG, G.; VARANASI, P.; LI, C.; LIU, H.; MELNICHENKO, Y.I.B.; SIMMONS, B.A.; KENT, M.S.; SINGH, S. Transition of cellulose crystalline structure and surface morphology of biomass as a function of ionic liquid pretreatment and its relation to enzymatic hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 933-941, 2011.

CODRESI, C.; RÂPEANU, G.; ALEXE, P. Effect of  $\beta$ -glucosidases in the making of chardonnay wines. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – **Food Technology**, v. 36, n.1, p. 9-17, 2012.

COLE, R.J.; KIRKSEY, J.W.; MOORE, J.H.; BLANKENSHIP, B.R.; DIENER, U.L.; DAVIS, N.D.. Tremorgenic toxin from *Penicillium verruculosum*. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 248-256, 1972.

CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE. Institut international du Canada pour le grain. **Canola Meal**. Feed Industry Guide. 4. ed. Manitoba, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Canola**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília/DF, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Canola**. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Brasília/DF, 2009.

COSTA, M.; TORRES, M.; MAGARIÑOS, H.; REYES, A. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. XII, n. 2, p. 163-175, 2010.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DEL RÍO, J.C.; RENCORET, J.; PRINSEN, P.; MARTÍNEZ, Á.T.; RALPH, J.; GUTIÉRREZ, A. Structural Characterization of Wheat Straw Lignin as Revealed by Analytical Pyrolysis, 2D-NMR, and Reductive Cleavage Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5922–5935, 2012.



DINGLEY, J.M. Life studies in the genus *Hypocrea* Fr. **Transactions of the Royal Society of New Zealand**, v. 84, p. 689-693, 1957.

FARINAS, C.S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; NETO, V.B.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - EMBRAPA**, v. 22, p. 17, 2008.

FERREIRA, M.F.P.; PENA, R.S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2010.

GAJERA, H.; DOMADIYA, R.; PATEL, S.; KAPOPARA, M.; GOLAKIYA, B. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 133-142, 2013.

GAO, D.; CHUNDAWATA, S.P.S.; SETHI, A.; BALAN, V.; GNANAKARANC, S.; DALE, B.E. Increased enzyme binding to substrate is not necessary for more efficient cellulose hydrolysis. **PNAS**, p. 1-6, 2013.

GATTINGER, L.D.; DUVNJAK, Z.; KHAN, A.W. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 21-25, 1990.

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. Biomass, In: **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**, 2. ed. New York: Cambridge University Press, 2007, p. 430-455.

GOURLAY, K.; ARANTES, V.; SADDLER, J. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 5, p. 1-14, 2012.

GOURLAY, K.; HU, J.; ARANTES, V.; ANDBERG, M.; SALOHEIMO, M.; PENTTILÄ, M.; SADDLER, J. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 498–503, 2013.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.Y.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 3, p. 61–69, 2009.

HORN, S.J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 45, p. 1-12, 2012.



IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Produção Agrícola Municipal Culturas temporárias e permanentes**, v. 38, p.1-97, Rio de Janeiro, 2011.

IQBAL, H.M.N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **Bioresources**, v. 8, n. 2, p. 3157-3176, 2013.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H.I.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes. **Bioresources**, v. 8, n. 1, p. 145-147, 2013.

JAKLITSCH, W.M.; SAMUELS, G.J.; DODD, S.L.; LU, B.S.; DRUZHININA, I.S. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 135–177, 2006.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, E.; TORRES-SALINAS, D.; MORENO, R.B; BAÑOS, R.R.; LÓPEZ-CÓZAR, E.D. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. **Scientometrics**, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2008.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

JOURDIER, E.; COHEN, C.; POUGHON, L.; LARROCHE, C.; MONOT, F.; CHAABANE, F.B. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 79, p. 1-12, 2013.

KANG, K.; WANG, S.; LAI, G.; LIU, G.; XING, M. Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 42, p. 1-9, 2013.

KHALID, M.; YANG, W.J.; KISHWAR, N.; RAJPUT, Z.I.; ARIJO, A.G. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 7, n. 6, p. 459-466, 2006.

KHURI, A.I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **WIREs Computational Statistics**, v. 2, p. 128-149, 2010.

KIM, N.; SOHN, M.J.; KIM, C.J.; KWON, H.J.; KIM, W.G. Verrulactones A and B, new inhibitors of *Staphylococcus aureus* enoyl-ACP reductase produced by *Penicillium verruculosum* F375. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 2503–2506, 2012.

KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G.J.; KUBICEK, C.P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, p. 298–309, 1998.

KOHLI, A.; SINGH, H. Optimization of processing parameters in induction hardening using response surface methodology. **Indian Academy of Sciences**, v. 36, p. 141–152, 2011.

KOJIMA, M.; OKAMOTO, K.; YANASE, H. Direct ethanol production from cellulosic materials by *Zymobacter palmae* carrying Cellulomonas endoglucanase and Ruminococcus  $\beta$ -glucosidase genes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 5137–5147, 2013.

KOWSARI, M. **Pictures for Lignocellulose structure**. Disponível em: <<http://biofuel.webgarden.com/>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

KOZLOVSKII, A.G.; ZHELIFONOVA, V.P.; ANTIPOVA, T.V., Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 1-10, 2013.

KRISHNA S.H.; RAO, K.C.S.; BABU, J.S.; REDDY, D.S. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 467-470, 2000.

KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L.; KUBICHEK-PRANZ, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 90-99, 1993.

KUMAR, D.; MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 63, p. 3-20, 2013.

LANGE, J.P. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 39–48, 2007.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G.J.; NIRENBERG, H.I.; PETRINI, O. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2418–2428, 1999.

LIMA, M.A.; OIVEILRA-NETO, M.; KADOWAKI, M.A.S.; ROSSETO, F.R.; PRATES, E.T.; SQUINA, F.M.; LEME, A.F.P.; SKAF, M.S.; POLIKARPOV, I. *Aspergillus niger* beta-glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape: insights into gh3 beta-glucosidases structure and function. **Journal of Biological Chemistry**, p. 1-27, 2013. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/early/2013/09/24/jbc.M113.479279.full.pdf+html>>. Acesso em 5 jan. 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LIU, C.J. Deciphering the enigma of lignification: precursor transport, oxidation, and the topochemistry of lignin assembly. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 304–317, 2012.

LIU, G.; QIN, Y.; LI, Z.; QU, Y. Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 962–975, 2013.

LUO, Q.; PENG, H.; ZHOU, M.; LIN, D.; RUAN, R.; WAN, Y.; ZHANG, J.; LIU, Y. Alkali extraction and physicochemical characterization of hemicelluloses from young bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel). **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 5817-5828, 2012.

MADUREIRA, H.C.; PEREIRA, T.N.S.; CUNHA, M.; KLEIN, D.E. Histological analysis of pollen-pistil interactions in sour passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Biocell**, v. 36, n. 2, p. 83-90, 2012.

MYCOBANK. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>> Acesso em: 10 jan. 2014.

MISHRA, B.K.; MISHRA, R.K.; MISHRA, R.C.; TIWARI, A.K.; YADAV, R.S.; DIKSHIT, A. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 2, p. 361-369, 2011.

MOHANRAM, S.; AMAT, D.; CHOUDHARY, J.; ARORA, A.; NAIN, L. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 15, 2013.

MONTGOMERY, D.C. Experimental design for product and process design and development. **The Statistician**, v. 48, p. 149-177, 1999.

MORI, C.; FERREIRA, P.E.P.; TOMM, G.O. **Estimativas de viabilidade econômica do cultivo de canola no Rio Grande do Sul e no Paraná, safra 2013**. Comunicado Técnico Online 330. Setembro, 2013 Passo Fundo, RS. Embrapa. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co330.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co330.htm)>. Acesso em: 07 jan. 2014.

MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, A. K.; KRANTHI, S. Reclassification of *Trichoderma viride* (TNAU), the most widely used commercial biofungicide in India, as *Trichoderma asperelloides*. **The Open Biotechnology Journal**, v. 7, p. 7-9, 2013.

MUSSATTO, S.I.; TEIXEIRA, J.A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 2, p. 897-907, 2010.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.

NAIR, V.C.; DUVNJAK, Z. Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 34, p. 183-188, 1990.

NASEEM, M.Z.; KHAN, S.H.; YOUSAF, M. Effect of feeding various levels of canola meal on the performance of broiler chicks. **Journal of Animal and Plant Sciences**. v. 16, p. 3-4, 2006.

NAVYA, P.N.; ROOPALI N.B.; PUSHPA S.M. Improved  $\beta$ -Glucosidase production from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. **International Journal of Current Research**. v. 4, n. 8, p. 123-129, 2012.

NICOLETTI, R.; STEFANO, M. *Penicillium restrictum* as an antagonist of plant pathogenic fungi. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 61-69, 2012.

NIGAM, P.S. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, p. 597-611, 2013.

OEHLERT, G.W. Response surface designs, In: **A first course in design and analysis of experiments**. Minneapolis: University of Minnesota, 2000, p. 509-536

PALACIOS-ORUETA A.; CHUVIECO E.; PARRA, A.; CARMONA-MORENO C. Biomass burning emissions: a review of models using remote-sensing data. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 104, p. 189-209, 2005.

PANDYA, J.R.; SABALPARA, A.N.; CHAWDA, S.K. *Trichoderma*: a particular weapon for biological control of phytopathogens. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 5, p. 1187-1191, 2011.

PARRY, N.J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J.V.; BHAT, M.K. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemistry Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.

PERSOON, C.H. Neuer veersuch einer systematischen eintheilung der schwamme – (Dispositio methodica fungorum). **Romer's News Mag. Bot.**, v. 1, p. 63-128, 1794.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, p. 58–68, 2012.

PEYRONEL, B. **I germi astmosferici dei funghi con micelio**. Dissertation, Padua, Italy, 1913.

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

QIAN, L.C. et al. Optimization of fermentation for  $\beta$ -Glucosidase production by *Aspergillus niger*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 11, p. 583-591, 2012.

QUEIROZ, M.S.R.; JANEIRO, D.I.; CUNHA, M.A.L.; MEDEIROS, J.S.; SABAA-SRUR, A.U.; DINIZ, M.F. F.M.; SANTOS, S.C. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. flavicarpa deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 89, p. 1-7, 2012.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P.F.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; RALPH, S.A.; CHRISTENSEN, J.H.; BOERJAN, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29–60, 2004.

REIS, J.; PAIVA, P.C.A.; TIESENHAUSEN, I.M.E.V.V.; REZENDE, C.A. Composição química, consumo voluntário e digestibilidade de silagens de resíduos do fruto de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) e de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) cv. Cameroon e suas combinações. **Ciência e Agroecologia**, v. 24, n. 1, p. 213-224, 2000.

ROWELL, R. Chemical modification of wood to produce stable and durable composites. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 46, n. 7-8, p. 443-448, 2012.

SADHU, S.; MAITI, T.K. Cellulase production by bacteria: A review. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 3, p. 235-258, 2013.

SAKAMOTO, S.; KOJIMA, F.; IGARASHI, M.; SAWA, R.; UMEKITA, M.; KUBOTA, Y.; NAKAE, K.; YAMAGUCHI, S.; ADACHI, H.; NISHIMURA, Y.; AKAMATSU, Y. Decalpenic acid, a novel small molecule from *Penicillium verruculosum* CR37010, induces early osteoblastic markers in pluripotent mesenchymal cells. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 703-708, 2010.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n.13, p. 5270-5295, 2008.

SHARADA, R.; VENKATESWARLU, G.; VENKATESHWAR, S.; RAO, M.A. Production of cellulase – A review. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 1070-1090, 2013.

SHARMA, P.; VIGNESH, K. P.; RAMESH, R.; SARAVANAN, K.; DEEP, S.; SHARMA, M.; MAHESH, S.; DINESH, S. Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19898-19907, 2011.

ŠIMKOVIČ, M.; KURUCOVÁ, A.; HUNOVÁ, M.; VAREČKA, L. Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. **Acta Chimica Slovaca**, v.1, n. 1, p. 250 – 264, 2008.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4665?lang=pt&region=BR> Acesso em: 10 jan. 2014a.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v7755?lang=pt&region=BR> Acesso em: 10 jan. 2014b.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SUKUMARAN, R.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SINITSYN, A.P.; OKUNEV, O.N.; SINITSYNA, O.A.; CHERNOGLAZOV, V.M.; POPOV, V.O. *Penicillium verruculosum* filamentous fungus strain of a highly active complex of



**celulases and accessory enzymes and a method of production of biocatalyst for cellulose and hemicellulose hydrolysis.** WO 2009/108081, 3 set. 2009.

SOLOV'EVA, I.V.; OKUNEV, O.N.; VEL'KOV, V.V.; KOSHELEV, A.V.; BUBNOVA, T.V.; KONDRAT'EVA, E.G.; SKOMAROVSKII, A.A.; SINITSYN, A.P. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. **Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 141–146, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

SWEENEY, M.D.; XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, v. 2, p. 244-263, 2012.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 104, 2013.

TIWARI, K.L.; JADHAV, S.K.; KUMAR, A. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. **Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 2, p. 203-210, 2011.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S.  $\beta$ -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

TOMM, G.O. **Cultivo de Canola**. Embrapa Trigo, Sistemas de produção, n. 3, versão eletrônica, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Canola/CultivodeCanola/>>. Acesso em: 07 jan. 2014.

TOMM, G.O. **Situação atual e perspectivas da canola no Brasil**. Comunicado Técnico Online n. 58, dez/2000. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co58.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co58.htm)> Acesso em: 9 jan. 2014.

TOMM, G.O.; RAPOSO, W.C. **Tropicalização da Canola**. In I Simpósio sobre Inovação e Criatividade na Empresa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008, Brasília/DF.

VERNAZA, M.G.; CHANG, Y.K.; STEEL, C.J. Efeito do teor de farelo de maracujá e da umidade e temperatura de extrusão no desenvolvimento de cereal matinal funcional orgânico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 145-154, 2009.

WEN, Z. LIAO; H. CHEN, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 31-39, 2004.

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 295–299, 2009.

XU, C.; HUANG, R.; TENG, L.; WANG, D.; HEMME, C.L.; BOROVOK, I.; HE, Q.; LAMED, R.; BAYER, E.A.; ZHOU, J.; XU, J. Structure and regulation of the cellulose degradome in *Clostridium cellulolyticum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 73, p. 2013.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, n. 4, p. 421–450, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, n. 86, p. 88-95, 2004.

YARBROUGH, J.M.; HIMMEL, M.E.; DING, S.Y. Plant cell wall characterization using scanning probe microscopy techniques. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 17 p. 1-11, 2009.

ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v.1, p. 227–234, 2007.

ZHANG, Y.H.P., HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.

ZHAO, L.; XIE, J.; ZHANG, X.; CAO, F.; PEI, J. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb1 to Rd. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 62–69, 2013.

ZIMBARDI, A.L.R.L.; SEHN, C.; MELEIRO, L.P.; SOUZA, F.H.M.; MASUI, D.C.; NOZAWA, M.S. F.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 2875-2902, 2013.

ZOPPAS, F.M.; MENEGUZZI, A.; TRAMONTINA, F. Alternatives for cellulase production in submerged fermentation with agroindustrial wastes. **International Journal of Modern Engineering Research**, v. 3, n. 4, p. 2374-2381, 2013.



## **APÊNDICE A – Tabelas de estatística descritiva**

**Tabela 1:** Estatística descritiva da análise dos dados de temperatura para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA - TEMPERATURA							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -99,00%	IC +99,00%
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>39,778</b>	<b>32,667</b>	<b>5,687</b>	<b>24,205</b>	<b>55,350</b>
Temperatura (°C)	30	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Temperatura (°C)	35	3	9,185	0,439	0,254	6,669	11,702
Temperatura (°C)	40	3	14,020	0,392	0,226	11,776	16,265
Temperatura (°C)	45	3	28,490	0,857	0,495	23,577	33,403
Temperatura (°C)	50	3	38,946	0,511	0,295	36,017	41,874
Temperatura (°C)	55	3	51,168	1,461	0,844	42,796	59,541
Temperatura (°C)	60	3	80,617	2,652	1,531	65,421	95,814
Temperatura (°C)	65	3	100,000	2,276	1,314	86,958	113,042
Temperatura (°C)	70	3	77,861	0,748	0,432	73,573	82,149
Temperatura (°C)	75	3	30,737	0,768	0,443	26,337	35,137
Temperatura (°C)	80	3	6,531	0,275	0,159	4,958	8,104

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 2:** Estatística descritiva da análise dos dados de pH para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*. Os dados foram transformados por arco-seno da raiz quadrada.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA - pH							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>0,057</b>	<b>0,035</b>	<b>0,007</b>	<b>0,042</b>	<b>0,072</b>
pH	30	3	0,019	0,000	0,000	0,018	0,020
pH	35	3	0,038	0,000	0,000	0,037	0,039
pH	40	3	0,087	0,002	0,001	0,083	0,091
pH	45	3	0,100	0,000	0,000	0,099	0,101
pH	50	3	0,090	0,001	0,000	0,088	0,092
pH	55	3	0,076	0,001	0,001	0,073	0,079
pH	60	3	0,044	0,001	0,000	0,042	0,046
pH	65	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 3:** Estatística descritiva da análise dos dados de estabilidade do pH para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – ESTABILIDADE DO pH							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>87,488</b>	<b>10,615</b>	<b>1,848</b>	<b>83,724</b>	<b>91,252</b>
pH	30	3	59,470	0,479	0,277	58,279	60,661
pH	35	3	87,307	2,854	1,648	80,217	94,398
pH	40	3	88,612	2,913	1,682	81,376	95,848
pH	45	3	100,000	1,631	0,942	95,949	104,051
pH	50	3	89,039	1,333	0,770	85,727	92,352
pH	55	3	94,164	0,854	0,493	92,042	96,285
pH	60	3	91,744	0,686	0,396	90,039	93,449
pH	65	3	78,861	3,916	2,261	69,134	88,589
pH	70	3	96,157	3,111	1,796	88,428	103,886
pH	75	3	86,477	0,931	0,537	84,165	88,789
pH	80	3	90,534	1,668	0,963	86,391	94,677

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 4:** Estatística descritiva da análise dos dados de efeito de íons metálicos e outras substâncias (concentração 2 mM) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – EFEITO DE SUBSTÂNCIAS (2 mM)							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>107,210</b>	<b>28,899</b>	<b>4,171</b>	<b>98,819</b>	<b>115,601</b>
Substâncias	Controle	3	100,00	4,470	2,581	88,896	111,104
Substâncias	CuSO <sub>4</sub>	3	125,019	4,981	2,876	112,646	137,393
Substâncias	ZnSO <sub>4</sub>	3	123,012	1,979	1,143	118,095	127,929
Substâncias	MnSO <sub>4</sub>	3	88,880	4,530	2,615	77,628	100,133
Substâncias	BaCl <sub>2</sub>	3	157,606	4,518	2,608	146,383	168,829
Substâncias	CaCl <sub>2</sub>	3	125,251	3,376	1,949	116,865	133,637
Substâncias	NH <sub>4</sub> Cl	3	88,803	3,539	2,043	80,013	97,594
Substâncias	NaCl	3	96,757	3,995	2,306	86,834	106,680
Substâncias	SDS	3	53,436	2,102	1,214	48,215	58,658
Substâncias	MgSO <sub>4</sub>	3	146,641	1,226	0,708	143,596	149,686
Substâncias	Citrato de sódio	3	136,216	3,677	2,123	127,081	145,352
Substâncias	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	125,174	4,916	2,838	112,962	137,386
Substâncias	HgCl <sub>2</sub>	3	59,073	2,847	1,644	52,002	66,145
Substâncias	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	3	89,189	1,062	0,613	86,552	91,826
Substâncias	EDTA	3	87,561	3,903	2,253	77,866	97,257
Substâncias	$\beta$ -mercaptoetanol	3	112,741	4,750	2,742	100,943	124,540

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 5:** Estatística descritiva da análise dos dados de efeito de íons metálicos e outras substâncias (concentração 10 mM) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*. Dados transformados por logaritmo neperiano (ln).

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – EFEITO DE SUBSTÂNCIAS (10 mM)							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>4,329</b>	<b>0,668</b>	<b>0,096</b>	<b>4,135</b>	<b>4,522</b>
Substâncias	Controle	3	4,604	0,046	0,027	4,490	4,719
Substâncias	CuSO4	3	4,290	0,049	0,029	4,167	4,412
Substâncias	ZnSO4	3	4,651	0,049	0,028	4,530	4,773
Substâncias	MnSO4	3	4,164	0,024	0,014	4,103	4,225
Substâncias	BaCl2	3	4,607	0,051	0,030	4,480	4,734
Substâncias	CaCl2	3	4,511	0,048	0,028	4,391	4,631
Substâncias	NH4Cl	3	4,621	0,003	0,002	4,614	4,629
Substâncias	NaCl	3	4,543	0,048	0,028	4,425	4,662
Substâncias	SDS	3	1,977	0,022	0,013	1,921	2,032
Substâncias	MgSO4	3	4,628	0,011	0,006	4,602	4,654
Substâncias	Citrato de sódio	3	4,754	0,036	0,021	4,665	4,842
Substâncias	Co(NO3)2	3	4,314	0,050	0,029	4,190	4,438
Substâncias	HgCl2	3	3,711	0,050	0,029	3,587	3,834
Substâncias	Pb(CH3COO)2	3	4,652	0,045	0,026	4,540	4,765
Substâncias	EDTA	3	4,437	0,015	0,009	4,400	4,474
Substâncias	$\beta$ -mercaptoetanol	3	4,794	0,001	0,001	4,791	4,797

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 6:** Estatística descritiva da análise dos dados de tolerância à glicose da  $\beta$ -glicosidase de *P. verruculosum*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – TOLERÂNCIA À GLICOSE							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>18</b>	<b>62,223</b>	<b>28,558</b>	<b>6,731</b>	<b>48,022</b>	<b>76,425</b>
Glicose mM	00	2	100,000	4,144	2,930	62,768	137,232
Glicose mM	02	2	90,755	3,911	2,765	55,620	125,890
Glicose mM	05	2	85,762	0,350	0,248	82,615	88,908
Glicose mM	10	2	78,003	1,518	1,073	64,368	91,637
Glicose mM	20	2	73,091	3,560	2,518	41,103	105,080
Glicose mM	40	2	48,452	0,934	0,660	40,062	56,843
Glicose mM	60	2	32,439	0,350	0,248	29,293	35,586
Glicose mM	80	2	27,652	1,167	0,825	17,164	38,140
Glicose mM	100	2	23,855	1,167	0,825	13,367	34,343

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 1:** Estatística descritiva da análise dos dados de temperatura para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA - TEMPERATURA							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -99,00%	IC +99,00%
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>54,391</b>	<b>34,690</b>	<b>6,039</b>	<b>42,091</b>	<b>66,692</b>
Temperatura (°C)	30	3	9,4915	0,339	0,196	8,649	10,334
Temperatura (°C)	35	3	15,932	0,339	0,196	15,090	16,774
Temperatura (°C)	40	3	35,480	1,529	0,883	31,683	39,277
Temperatura (°C)	45	3	41,469	1,740	1,004	37,148	45,790
Temperatura (°C)	50	3	62,260	2,719	1,570	55,506	69,014
Temperatura (°C)	55	3	74,689	2,071	1,196	69,544	79,835
Temperatura (°C)	60	3	95,480	2,071	1,196	90,335	100,625
Temperatura (°C)	65	3	100,000	1,017	0,587	97,474	102,526
Temperatura (°C)	70	3	88,814	1,017	0,587	86,287	91,340
Temperatura (°C)	75	3	74,689	2,257	1,303	69,082	80,296
Temperatura (°C)	80	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 2:** Estatística descritiva da análise dos dados de pH para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*. Os dados foram transformados por arco-seno da raiz quadrada.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA - pH							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>0,062</b>	<b>0,028</b>	<b>0,006</b>	<b>0,051</b>	<b>0,074</b>
pH	30	3	0,030	0,001	0,000	0,029	0,032
pH	35	3	0,063	0,001	0,001	0,060	0,067
pH	40	3	0,090	0,001	0,000	0,088	0,092
pH	45	3	0,100	0,001	0,001	0,098	0,103
pH	50	3	0,087	0,002	0,001	0,083	0,091
pH	55	3	0,069	0,001	0,001	0,066	0,072
pH	60	3	0,034	0,000	0,000	0,033	0,035
pH	65	3	0,026	0,000	0,000	0,026	0,027

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 3:** Estatística descritiva da análise dos dados de estabilidade do pH para a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – ESTABILIDADE DO pH							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>80,174</b>	<b>17,494</b>	<b>3,045</b>	<b>73,971</b>	<b>86,377</b>
pH	30	3	35,593	1,017	0,587	33,067	38,120
pH	35	3	100,000	3,107	1,794	92,282	107,718
pH	40	3	86,440	2,242	1,295	80,871	92,010
pH	45	3	91,808	2,976	1,718	84,414	99,201
pH	50	3	75,423	2,542	1,468	69,108	81,739
pH	55	3	94,067	2,542	1,468	87,752	100,383
pH	60	3	91,243	3,425	1,977	82,735	99,751
pH	65	3	76,271	3,056	1,764	68,681	83,861
pH	70	3	65,819	2,133	1,231	60,521	71,117
pH	75	3	89,265	2,133	1,231	83,967	94,563
pH	80	3	75,988	2,589	1,495	69,557	82,420

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 4:** Estatística descritiva da análise dos dados de efeito de íons metálicos e outras substâncias (concentração 2 mM) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – EFEITO DE SUBSTÂNCIAS (2 mM)							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>82,143</b>	<b>23,819</b>	<b>3,438</b>	<b>75,227</b>	<b>89,060</b>
Substâncias	Controle	3	100	2,057	1,188	94,890	105,110
Substâncias	CuSO <sub>4</sub>	3	80,558	2,131	1,231	75,263	85,853
Substâncias	ZnSO <sub>4</sub>	3	89,395	1,432	0,827	85,838	92,953
Substâncias	MnSO <sub>4</sub>	3	34,977	1,319	0,761	31,701	38,253
Substâncias	BaCl <sub>2</sub>	3	74,884	1,432	0,827	71,326	78,441
Substâncias	CaCl <sub>2</sub>	3	110,419	2,984	1,723	103,006	117,831
Substâncias	NH <sub>4</sub> Cl	3	99,907	0,279	0,161	99,214	100,600
Substâncias	NaCl	3	87,163	2,593	1,497	80,721	93,604
Substâncias	SDS	3	18,140	0,872	0,504	15,973	20,306
Substâncias	MgSO <sub>4</sub>	3	95,721	3,649	2,107	86,656	104,786
Substâncias	Citrato de sódio	3	83,721	2,749	1,587	76,893	90,549
Substâncias	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	76,186	1,216	0,702	73,164	79,208
Substâncias	HgCl <sub>2</sub>	3	80,558	1,611	0,930	76,556	84,561
Substâncias	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	3	90,698	3,692	2,131	81,527	99,869
Substâncias	EDTA	3	84,525	1,250	0,722	81,419	87,631
Substâncias	$\beta$ -mercaptoetanol	3	107,442	3,692	2,131	98,271	116,613

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 5:** Estatística descritiva da análise dos dados de efeito de íons metálicos e outras substâncias (concentração 10 mM) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*. Dados transformados por logaritmo neperiano (ln).

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – EFEITO DE SUBSTÂNCIAS (10 mM)							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Residual (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>4,208</b>	<b>0,691</b>	<b>0,100</b>	<b>4,007</b>	<b>4,409</b>
Substâncias	Controle	3	4,605	0,021	0,012	4,554	4,656
Substâncias	CuSO <sub>4</sub>	3	4,307	0,010	0,006	4,282	4,332
Substâncias	ZnSO <sub>4</sub>	3	4,420	0,044	0,026	4,310	4,531
Substâncias	MnSO <sub>4</sub>	3	3,107	0,030	0,017	3,033	3,180
Substâncias	BaCl <sub>2</sub>	3	4,539	0,051	0,029	4,412	4,665
Substâncias	CaCl <sub>2</sub>	3	4,502	0,009	0,005	4,480	4,525
Substâncias	NH <sub>4</sub> Cl	3	4,440	0,045	0,026	4,328	4,552
Substâncias	NaCl	3	4,457	0,016	0,009	4,417	4,497
Substâncias	SDS	3	1,930	0,040	0,023	1,830	2,030
Substâncias	MgSO <sub>4</sub>	3	4,461	0,016	0,009	4,422	4,501
Substâncias	Citrato de sódio	3	4,408	0,034	0,020	4,323	4,493
Substâncias	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	4,300	0,039	0,023	4,203	4,398
Substâncias	HgCl <sub>2</sub>	3	4,142	0,048	0,028	4,022	4,262
Substâncias	Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	3	4,717	0,031	0,018	4,640	4,793
Substâncias	EDTA	3	4,469	0,012	0,007	4,439	4,499
Substâncias	$\beta$ -mercaptoetanol	3	4,524	0,002	0,001	4,519	4,528

IC = Intervalo de Confiança

**Tabela 6:** Estatística descritiva da análise dos dados de tolerância à glicose da  $\beta$ -glicosidase de *T. viride*.

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – TOLERÂNCIA À GLICOSE							
Fator analisado	Nível dos fatores	N	Atividade Relativa (%)				
			Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC -95,00%	IC +95,00%
<b>Total</b>		<b>18</b>	<b>61,728</b>	<b>29,609</b>	<b>6,979</b>	<b>47,004</b>	<b>76,453</b>
Glicose mM	00	2	100,000	1,089	0,770	90,215	109,785
Glicose mM	02	2	91,089	0,622	0,440	85,498	96,680
Glicose mM	05	2	88,889	0,311	0,220	86,093	91,685
Glicose mM	10	2	77,008	3,734	2,640	43,460	110,555
Glicose mM	20	2	70,297	3,578	2,530	38,147	102,447
Glicose mM	40	2	50,825	1,245	0,880	39,643	62,008
Glicose mM	60	2	31,903	1,556	1,100	17,925	45,881
Glicose mM	80	2	25,963	0,311	0,220	23,167	28,758
Glicose mM	100	2	19,582	0,933	0,660	11,195	27,969

IC = Intervalo de Confiança