



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
ENZIMAS UTILIZANDO RESÍDUO FARELO DE
TRIGO COMO SUBSTRATO POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

CHRISTIANE MARIA CHRISTINA NÓBREGA BAKKER

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gorete Ribeiro de Macedo

Coorientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Natal/RN

Abril/2017

Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ENZIMAS
UTILIZANDO RESÍDUO FARELO DE TRIGO COMO
SUBSTRATO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutora em Engenharia Química, sob a orientação da Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo e coorientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

Natal/RN
Abril/2017

Catálogo de Publicação na Fonte.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN / Sistema de Bibliotecas - SISBI
Biblioteca Setorial Especializada em Engenharia Química - CT

Bakker, Christiane Maria Christina Nóbrega.

Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido/
Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker. - Natal, 2017.
141f.: il.

Orientador: Gorete Ribeiro de Macedo.

Coorientador: Everaldo Silvino dos Santos.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

1. Resíduos sólidos - Tese. 2. Farelo de trigo - Tese. 3. Produtos biotecnológicos - Tese. 4. Xilanase - Tese. 5. Lipase - Tese. I. Macedo, Gorete Ribeiro de. II. Santos, Everaldo Silvino dos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

BAKKER, Christiane Maria Christina Nóbrega. Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia química, Natal, Brasil, 2017.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gorete Ribeiro de Macedo

Coorientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

RESUMO: Tendo em vista a dificuldade de destinação final nos resíduos agroindustriais de unidades do grupo M. Dias Branco S.A., o presente trabalho teve como objetivo buscar alternativas para o aproveitamento de resíduos da produção de margarina e farelo de trigo como potenciais substratos para produção de produtos biotecnológicos. Inicialmente os resíduos foram caracterizados e se prospectou, nos respectivos resíduos, cepas potenciais produtoras de enzimas. Nos cultivos foram utilizados consórcios fúngicos prospectados do resíduo farelo de trigo de unidade fabril, bem como cepas de fungos *Aspergillus oryzae* CCT n° 0975 ATCC9362, *Trichoderma reesei* CCT n° 2768 - QM 9414 e a bactéria *Bacillus cereus* CCT n° 5457, adquiridos da coleção de culturas da Fundação André Tosello-SP. Na avaliação do potencial dos resíduos como substrato, em resíduos de margarina não foi observado crescimento microbiano nas condições testadas, apesar desse apresentar consideráveis percentuais de ácidos graxos, assim, não prosseguiu-se os estudos com os resíduos de borra da refinaria e efluente da produção de margarinas. Como o farelo de trigo apresentou cerca de 40% de hemicelulose, realizou-se ensaios de fermentação em estado sólido, com o material não lavado e não autoclavado, indentificando-se produção de xilanases nas primeiras 72 h de cultivo. A partir deste resultado foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - planejamento fatorial 2³, com três repetições no ponto central e seis pontos axiais, obtendo a otimização dos fatores do processo: umidade, pH e granulometria. Os fatores foram considerados significativos pela ANOVA com o nível de confiança de 95%. O resultado otimizado de atividade enzimática de 11,78 ±0,01 UI/g ou 3,54 UI/mL utilizando pH 3,3, granulometria de 900,0 µm e umidade de 40% foi verificado. O caldo enzimático obtido foi avaliado através da eletroforese, onde foi possível observar duas bandas predominantes de massa molar 14,4 e 30 kDa. Desnaturação a partir de 60°C, extração estável com tampão acetato de sódio e com ponto isoelétrico em pH na faixa de 5,5-6,5. O caldo foi considerado eficiente na modificação de tipificação de farinhas de trigo pelo estudo dos parâmetros reológicos de massa fabricada com farinha aditivada com o caldo enzimático produzido, adotando-se análise do *falling number* e

alveografia. O caldo se mostrou estável por 30 dias e manteve 50% de sua atividade xilanólítica por 6 meses.

O farelo de trigo se mostrou potencial substrato para induzir a produção de enzimas por FES utilizando-se o microrganismo *Aspergillus oryzae*. O extrato enzimático obtido apresentou viabilidade para aplicação na panificação com possibilidade de ser inserido na estratégia de inclusão de novos produtos de inovação em empresas de moagem.

Palavras-chave: Farelo de trigo, *Aspergillus oryzae*, resíduo de refinaria de margarina, xilanase.

Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker

Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutora em Engenharia Química, sob a orientação da Prof. Dr. Gorete Ribeiro de Macedo.

Aprovado(a) em 15/03/2017



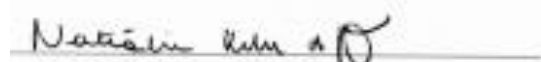
Prof. Dr. Gorete Ribeiro de Macedo

Orientador(a)-DEQ/UFRN



Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

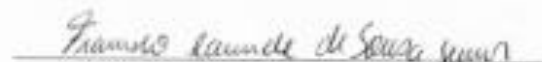
Coorientador-DEQ/UFRN



Dr. Nathália Kelly de Araújo

Membro interno- Bolsista

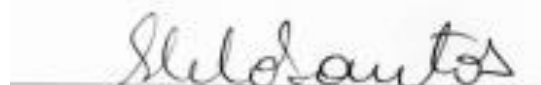
PNPD-CAPES/UFRN



Dr. Francisco Canindé de Sousa Jr.

Membro interno-Prof. Dep.

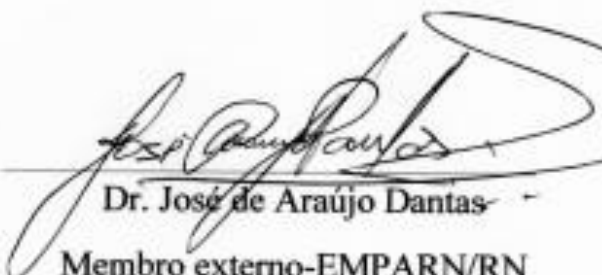
Farmácia/UFRN



Prof. Dr. Sharline F. de Melo Santos

Membro externo- Prof. Dep.

Eng. Química/UFPB



Dr. José de Araújo Dantas

Membro externo-EMPARN/RN

ABSTRACT

In order to point alternatives for wheat bran disposal destination generated in food industries sector M. Dias Branco S.A., thus contributing with the reduction of the resultant impact of the deposition of residues in the environment. It has been evaluated in the present work the potential of the wheat bran as substrate for xylanase production by solid state fermentation using fungal consortiums as well as the *Aspergillus oryzae* (ATCC9362), *Trichoderma reesei* (2768), *Bacillus cereus* CCT n° 5457, from Fundação André Tosello-SP. The use of non-washed and non-autoclaved wheat bran as carbon and energy source on the solid state fermentation by the *Aspergillus oryzae* fungus showed greater percentage of the produced protein after 72 hours of cultivation. The use of a Central Composite Rotatable Design (CCRD) - 2³ factorial planning with three repetitions at the central point as well as six axial points – coupled to Surface Response Methodology (SRM) allowed to assay the influence of humidity, pH and grain size (independent variables or factors) on the xylanase activity (dependent variable or response) as well as to optimize the best condition for the enzyme production. Results showed that all factors and their combination were significant at 95% confidence level. The optimized xylanase activity was (11.78 ±0,01) UI/g or (3.54) UI/mL obtained at 40% of humidity, pH 3.3 with grain size of 900.0µm. The produced broth was stable for 6 months and remained about (50%) of the initial xylanase activity at 4°C. SDS-PAGE assay showed that xylanase has 14,4-30 kDa molar mass. The obtained enzymatic broth was efficient to modify wheat flours as shown by the *falling number* rheologic parameters and alveography assay.

Key-words: Xylanase production, wheat bran, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*.

SUMÁRIO

Capa	I
Contra capa.....	II
Resumo.....	IV
Folha de assinaturas	VI
Abstract	VII
Sumário.....	VIII
Lista de figuras	XII
Lista de tabelas.....	XIV
Lista de siglas.....	XVI
1. Introdução e Objetivo.....	16
1.1 Objetivo geral.....	21
1.2 Objetivos específicos	21
2. Revisão Bibliográfica.....	22
2.1 Obtenção de enzimas microbianas	23
2.1.1 Substrato de resíduos de margarina	24
2.1.2 Produção microbiana de enzimas usando óleos e derivados	25
2.1.3 Lipases.....	29
2.1.4 Microrganismos produtores de lipase.....	30
2.1.5 Farelo de trigo.....	32
2.1.6 Obtenção de bioprodutos utilizando farelo de trigo e derivados.....	36
2.1.7 Xilanases.....	37
2.1.8 Microrganismos produtores de xilanase.....	50
2.2 Processos fermentativos em estado sólido e suas características	57

	2.2.1 Fatores de influência no processo de fermentação em estado sólido “FES”	60
3.	Matérial e métodos	64
3.1	Caracterização físico-química dos resíduos e fabricação de margarinas.....	65
	3.1.1 Classificação dos resíduos da produção de margarinas.....	66
3.2	Caracterização do farelo de trigo.....	66
	3.2.1 Granulometria.....	66
	3.2.2 Umidade (perda por dessecação)	66
	3.2.3 Proteína total.....	67
	3.2.4 Cinzas (resíduo por incineração)	67
	3.2.5 Determinação pH.....	68
	3.2.6 Densidade aparente.....	68
	3.2.7 Caracterização dos resíduos lignocelulósicos.....	68
	3.2.7.1 Determinação da umidade.....	68
	3.2.7.2 Determinação de extrativos.....	69
	3.2.7.3 Hidrólise com H ₂ SO ₄ (72%)	70
	3.2.7.4 Determinação dos teores de celulose, por análise dos polissacarídeos por cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE	70
	3.2.7.5 Lignina insolúvel	71
	3.2.7.6 Teor de cinzas da lignina insolúvel e cinzas totais..	71
	3.2.7.7 Lignina solúvel.....	72
3.3	Produção enzimas por FES.....	73
	3.3.1 Microrganismos testados.....	73
	3.3.2 Condições de tratamento prévio do farelo de trigo avaliadas.....	73
	3.3.3 Manutenção dos microrganismos	74
	3.3.3.1 Bactéria.....	74

3.3.3.2 Fungos.....	74
3.3.4 Preparo dos esporos.....	75
3.3.5 Obtenção do pré-inóculo.....	75
3.3.6 Preparo de inóculo.....	76
3.3.7 Processo FES para produção de enzimas	76
3.3.8 Planejamento experimental para identificação das condições ótimas de cultivo	77
3.4 Extração da enzima xilanase	78
3.5 Determinação do percentual de proteína no caldo fermentado pelo método de Bradford	79
3.6 Determinação da atividade enzimática.....	80
3.7 Determinação de açúcares redutores.....	81
3.7.1 Metodo do ácido dinitrosalicílico (DNS)	81
3.8 Análises de identificação do caldo enzimático	81
3.8.1 Determinação do ponto isoelétrico e eletroforese “SDS”..	81
3.8.2 Estabilidade da enzima.....	82
3.8.3 Aplicação do extrato enzimático - Análise de <i>falling number</i> ou número de queda	82
3.8.4 Análise da alveografia.....	83
4. Resultados e discussão.....	85
4.1 Bioprospecção e caracterização dos resíduos da produção de margarinas.	85
4.2 Caracterizaçãodo resíduo do farelo de trigo.....	87
4.3 Seleção de microrganismos e tratamento do substrato.....	88
4.4 Otimização das condições de cultivo por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	90
4.5 Teste das condições de extração	94
4.6 Estabilidade do caldo enzimático.....	95
4.7 Eletroforese “SDS – PAGE”	100
4.8 Avaliação de comportamento reológico da farinha pela análise do <i>falling number</i> e alveografia.....	102
5. Conclusões.....	107

6.	Referências bibliográficas	110
7.	Anexos	126

Lista de figuras

Figura 2.1 Esquema geral de um processo fermentativo (Schmidell, 2001)	24
Figura 2.2 Esquema do processo de refino físico para óleo de palma, ressaltando o resíduo da borra da refinaria vendido	26
Figura 2.3 Esquema do processo de desodorização, ressaltando o resíduo gerado da borra da ETE destinado ao aterro sanitário municipal	27
Figura 2.4 Armazenagem de borra da refinaria	28
Figura 2.5 Armazenagem de borra da ETE	28
Figura 2.6 Esquema das estruturas do grão de trigo e química da xilana do trigo	33
Figura 2.7 Desestruturação química para a formação da xilose	34
Figura 2.8 Complexo lignocelulósico	36
Figura 2.9 Atividade de um complexo lignocelulósico	38
Figura 2.10 Múltiplas reações que ocorrem na FES	60
Figura 4.1 Observação do crescimento microbiano no resíduo da ETE, seguido do resíduo da refinaria, resíduo farelo de trigo NLNA e farelo de trigo LA	86
Figura 4.2 Diagrama de farelo para o DCCR, com nível de (95%) de confiança, para a produção de xilanases por <i>A. oryzae</i> usando farelo de trigo como substrato em FES	92

Figura 4.3 Valores preditos em função dos valores observados para a atividade xilanásica obtida pelo DCCR ao se utilizar farelo de trigo como substrato e o fungo <i>A. oryzae</i> em FES	93
Figura 4.4 Superfície de resposta do DCCR da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por <i>A. oryzae</i> à 32 °C e granulometria 900 µm – Ponto central	94
Figura 4.5 Caracterização de proteínas secretadas no ensaio da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por <i>Aspergillus oryzae</i>	100
Figura 4.6 Geis representativos da eletroforese do caldo bruto em contato por 2 horas com diferentes tampões	101
Figura 4.7 Cartas alveograficas de três tipificações de farinhas para a área de alimentos	105
Figura 4.8 Cartas alveograficas; 1) Farinha padrão e 2) Farinha adicionada do caldo enzimático obtido por <i>A. oryzae</i>	105

Lista de tabelas

Tabela 2.1 Pesquisas que realizaram caracterização do substrato da palha/farelo de trigo quanto ao seu percentual de compostos lignocelulósicos.....	35
Tabela 2.2 Estudos para produção de xilanase.....	40
Tabela 2.3 Fungos produtores de xilanases em resíduos agroindustriais. (Sanches e Cardona, 2009).....	51
Tabela 2.4 Microrganismos produtores de enzimas xilanolítica (Lemos, 2006).....	54
Tabela 3.1 Componentes precursores da celulose (C) e hemicelulose (H) e seus respectivos valores de conversão.....	71
Tabela 3.2 Delineamento Composto Central Rotacional: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e seis ensaios axiais com rotabilidade.....	78
Tabela 3.3 Delineamento Composto Central com Rotabilidade (DCCR) para otimização da produção de xilanases por <i>A. oryzae</i> usando farelo de trigo como substrato.....	78
Tabela 4.1 Teor de compostos orgânicos encontrados na borra da refinaria.....	86
Tabela 4.2 Percentuais de celulose, hemicelulose e lignina do farelo de trigo.....	87
Tabela 4.3 Escolha do microrganismo para produção enzimática por fermentação em 7 dias por <i>A. oryzae</i> com 10 mL de inóculo no substrato farelo de trigo granulometria 900 μm , pH 6 e umidade 13,6%.....	89
Tabela 4.4 Atividade enzimática do delineamento Composto Central com	

Rotabilidade (DCCR) para otimização da produção de xilanases por <i>A. oryzae</i> usando farelo de trigo como substrato	91
Tabela 4.5 Comparativo da extração através da atividade enzimática do ensaio de fermentação em estado sólido do farelo de trigo por <i>A. oryzae</i> com pH = 4, umidade= 50% e gran.= 1200µm.....	95
Tabela 4.6 Resultado da atividade enzimática, concentração enzimática e estabilidade da xilanase.....	96
Tabela 4.7 – Estabilidade da enzima avaliada pela atividade enzimática em variadas temperaturas.....	96
Tabela 4.8 – Influência do pH na atividade enzimática (Atividade enzimática do caldo bruto foi 1.84 ± 0.01).....	98
Tabela 4.9 – Número de queda (<i>Falling Number</i> - FN), alveografia e trabalho da farinha padrão e farinha adicionada de xilanases produzida por <i>A. oryzae</i> e valores comparativos da classificação de farinhas na área de alimentos.....	103

Lista de siglas

AACC – American Association of Cereal Chemists

ABIMA – Associação Brasileira das Indústrias de Massas Alimentícias

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABRELPE – Associação Brasileira de Limpeza Pública

ADQ – Análise Descritiva Qualitativa

AE – Atividade enzimática

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA – Análise de variância

AR – Açúcares redutores

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

BSA – Albumina Bovina Sérica

C – Carbono

CE – Ceará

°C – Graus Celsius

DCCR - Delineamento Composto Central com Rotabilidade

DAG – Diacilglicerídeos

EC – Enzyme Commission

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation

FDA – Food and Drugs Administration

FS – Fermentação Submersa

FES – Fermentação em Estado Sólido

GMP – Grande Moinho Potiguar

GME – Gorduras e Margarinas Especiais

H – Hidrogênio

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ICC – International Color Consortium

IEC – International Engineering Consortium

IN – Instrução Normativa
IPEA – Instituto de Pesquisa Agronômica
ISA – Índice de Solubilidade em Água
ISO – International Organization for Standardization
ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos
km – Constante de Michaelis-Menten
kDa – Kilo Dalton
LA – Lavado e Autoclavado
LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica
MAG – Monoacilglicerídeos
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NBR – Normas Brasileiras
OMS – Organização Mundial da Saúde
N – Nitrogênio
NLNA – Não Lavado Não Autoclavado
PDA – Potato Dextrose Agar
PI – Ponto Isoelétrico
PIQ – Padrão de Identidade e Qualidade
PNRS – Política Nacional de Resíduos Sólidos
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SRM – Surface Response Methodology
VMP – Valor Máximo Permitido
V_{máx.} – Velocidade máxima
UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Capítulo 1

Introdução e objetivo

1. Introdução e objetivos

A Política Nacional de Resíduos Sólidos - PNRS, em vigor desde agosto de 2010 gera grande expectativa quanto a melhoria na destinação de resíduos no Brasil devido à obrigatoriedade de envolvimento da iniciativa privada, iniciando mudanças permanentes na cultura ambiental. Em 2013 a revista Anuário Ambiental divulgou que dentre as 820 empresas pesquisadas apenas 7 entre 10 declaravam seus impactos ambientais.

Com base em dados do Ministério do Meio Ambiente, a ONU estima o mercado brasileiro em dois bilhões de dólares. O Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), estima que o Brasil perdeu oito bilhões de reais por ano com falta de reciclagem (Análise Editorial, 2010).

O certo é que o país deve avançar quanto a destinação dos resíduos sólidos e a Associação Brasileira de Limpeza Pública e resíduos (ABRELPE) chama a atenção sobre o mercado brasileiro organizado de resíduos que, em 2010, registrou destinação somente para aterros sanitários de cerca de 58% dos resíduos e 24% para aterros controlados. Dentro das pesquisas em resíduos, 59% das empresas entrevistadas em 2011 declaram promover o reuso contra apenas 47% declarados em 2007, e 57% declaram possuir metas de redução de geração. Representando uma fração de 19 bilhões de reais movimentado pelo setor de limpeza pública em 2010.

Pelas respostas empresariais as ações mais populares foram: coleta seletiva de lixo (91%), monitoramento de indicadores (77%), ações de redução de impacto (68%) e tecnologias para reduzir a geração (51%). Dentre os principais pontos da nova lei são considerados sete medidas que irão impactar na forma pela qual o Brasil trata o seu resíduo: Logística reversa, fim dos lixões, planos municipais, responsabilidade compartilhada, cooperativas de catadores, financiamentos para consórcios e novas tecnologias. Dentro desta última alternativa, e nos conceitos ambientais modernos, não é mais aceito a chamada produção que agrega impactos ambientais. E sim, incentivada a produção e pesquisa em

matrizes energéticas capazes de mitigar seus impactos, bem como a produção de outros produtos de interesse comercial pela rota biotecnológica (biorrefinaria).

Assim, os bio-combustíveis são apresentados como uma alternativa viável e crescente de possibilidade de aproveitamento de resíduos já gerados no suprimento alimentar, causando reduzido impacto. E, ao lado da geração de bio-combustíveis, a síntese biotecnológica de um grande número de outros produtos, por exemplo, enzimas como lipases e xilanases podem ser viáveis comercialmente (Análise Editorial, 2010).

Guedes *et al.* (2010) comentava que os resíduos são uma fonte alternativa importante para crescimento microbiano e produção de enzimas industriais. Dentre as alternativas para resíduos gerados pelo agronegócio como um todo estão à venda, reciclagem, transformação, incineração ou destinação ao aterro, sendo a transformação a que mais instiga os pesquisadores, por gerar possibilidades de agregação de valor a estes subprodutos. Enzimas estão sendo também produzidas a partir de substratos agroindustriais, com o objetivo de diminuir os resíduos enviados à aterros sanitários. Tornando possível assim, a produção de produtos biotecnológicos de maior valor agregado.

As lipases são enzimas largamente disponíveis em animais, plantas e microrganismos e são responsáveis pela hidrólise das gorduras insolúveis, óleos e ésteres de ácidos graxos, resultando na hidrólise completa em ácidos graxos e gliceróis. Estas enzimas encontram aplicações em diversos setores tais como alimentício, petróleo, químico, biodiesel, tratamento de efluentes, indústria de polpa de celulose, farmacêutica e indústria de detergentes. São consideradas excelentes substâncias para síntese química clássica devido a sua versatilidade para catalisar variadas reações, tornando sua utilização de vasta aplicação (Barros *et al.*, 2010).

As xilanases são enzimas produzidas por diversos microrganismos que degradam o polissacarídeo beta-1,4- xilano em xilose, decompondo assim a hemicelulose. As aplicações comerciais incluem o branqueamento de pasta de papel sem uso de cloro, o aumento da digestibilidade para alimentação animal, produção de sucos, mucilagem de café, indústria farmacêutica, melhoramentos na panificação, produção de bebidas alcoólicas e álcool. Produtos da hidrólise de xilano, como a xilose podem ser convertidos em etanol, xilitol, solventes e adoçantes (Silva, 2014).

O grande potencial biotecnológico das xilanases está na sua aplicação nas etapas de branqueamento do papel, onde os xilanos são hidrolisados em condições de temperatura controlada para facilitar a remoção da lignina, diminuindo a quantidade de compostos clorados utilizados (Vieira, 2005). Na formação do chamado papel *kraft* sem branqueamento químico tão fortemente divulgado como produto ecologicamente correto e de produção sustentável. Diversas aplicações da hidrólise da xilana para consumo de enzimas xilanolíticas envolvem: digestibilidade de material lignocelulósico para ração animal, clarificação de sucos, fabricação de café solúvel, como aditivo na produção de leite e derivados, etc. (Lopes *et al.*, 2009).

Para Maciel (2006) a produção das xilanases com características bioquímicas adequadas à aplicação industrial representa objeto de estudo relevante, cujo enfoque no desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias visa aumento de produtividade, de escala e redução de custos tornando-se assunto de extrema importância.

Em unidade do grupo M. Dias Branco três resíduos estavam disponíveis para avaliação de potencial tecnológico de transformação: 1) A borra da fabricação de margarina da refinaria, que em 2013 tinha a venda como destino para fabricação de sabão, com preço entre R\$ 0,15 e 0,18 centavos/Kg, totalizando em média de 15 toneladas por mês; 2) a borra da estação de tratamento de efluentes – ETE, destinada ao aterro sanitário com custo de R\$ 361,72 reais por container de aproximadamente 5 toneladas, com saída diária; e 3) O farelo de trigo, resíduo da produção de farinha de trigo que representa cerca de 25% da matéria-prima inicial, o que corresponde a cerca de 25.000 ton/ano de resíduos. No ano da coleta da amostra (2010) tal subproduto da produção de farinha de trigo era comercializado com a denominação de farelo de trigo para ração animal, fiscalizado pelo MAPA e vendido a R\$ 14,0 reais (quatorze reais) o saco com 30 Kg. No presente trabalho buscou-se analisar alternativa biotecnológica mais rentável para agregação de valor do resíduo devido ao seu potencial protéico. Justifica-se, portanto, o esforço em pesquisar alternativas de utilização destes resíduos de baixo custo com potencial nutritivo descrito na literatura (Grafziola *et al.*, 2002; Coutate, 2004; Cardoso, 2008; Cherubini, 2010; Chanutnum e Inphanichakarn, 2012) para servirem de substrato na produção de produtos biotecnológicos.

Dentro da bioprospecção microbiana identificou-se na literatura como frequente a presença de microrganismos na microbiota natural do resíduo (Brijwani *et al.*, 2010), assim

realizou-se uma prospecção de microrganismos presentes no resíduo de farelo de trigo que foram investigados como produtores de enzimas, por esses já estarem adaptados ao consumo do substrato trigo como fonte de carbono.

Como o principal constituinte das hemiceluloses são as xilanas, e por ser o maior percentual presente no farelo de trigo cerca de 40%, decidiu-se avaliar o potencial do farelo como substrato para produção de xilanases. Adotando a fermentação em estado sólido e atuando o substrato como indutor de produção da xilanase. Como rotina existe a importação da xilanase na cadeia de produção de biscoito e panificação. Como aditivos são usados na modificação das características da farinha para cada tipo de produto desejado, principalmente biscoitos salgados e biscoitos tipo *wafer* que necessitam de uma farinha de característica reológica fraca; proporcionando pouco crescimento da massa no forneamento. Justifica-se, portanto, o empenho na pesquisa de estratégias de obtenção de produtos neste ramo do negócio do grupo que poderá gerar produto de maior valor agregado a partir de um subproduto atualmente vendido como ração animal. Neste contexto de pesquisa de produção de enzimas com resíduos agroindustriais, visando sustentabilidade empresarial o presente estudo foi realizado.

A estratégia de resposta à hipótese e questionamentos foram utilizados para guiar esta pesquisa:

Os resíduos da fabricação de margarinas e o farelo de trigo podem ser substratos viáveis na produção de enzimas?

Quais microrganismos são produtores de xilanase e lipase?

Quais as melhores condições de preparo do pré-inóculo e inóculo?

Quais as melhores condições de produção da enzima?

O produto resultante do processo fermentativo tem aplicação na indústria alimentícia?

E o desenvolvimento deste trabalho foi dividido em quatro etapas: caracterização dos resíduos, prospecção de microrganismos produtores de enzimas, otimização dos parâmetros da fermentação e estudo de caracterização enzimática com aplicação do caldo obtido.

1.1 - Objetivo geral

Avaliar a viabilidade tecnológica de resíduos oriundos da fabricação de margarina e da moagem de trigo de duas unidades do grupo M. Dias Branco, como substrato na produção de enzimas lipases e xilanases respectivamente, por fermentação em estado sólido.

1.2 - Objetivos específicos

- Caracterizar qualitativamente e quantitativamente os resíduos da fabricação de margarina, borra da estação de tratamento de efluentes (ETE) e refinaria; e resíduos de moagem de trigo, denominado farelo de trigo;
- Prospeccionar presença de microrganismos potenciais produtores de lipases e xilanases;
- Realizar ensaios de fermentação em estado sólido com microrganismos resultantes da prospecção, bem como com microrganismos da coleção de culturas da fundação André Tosello, para avaliar o potencial dos resíduos na produção de enzimas;
- Otimizar as condições de cultivo e síntese das enzimas por FES utilizando a técnica do planejamento fatorial associado à metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar a substituição de tampão acetato por água destilada na extração da enzima;
- Estimar a massa molar das proteínas produzidas por eletroforese;
- Realizar análise de estabilidade do produto obtido;
- Realizar análise de sua aplicação na área de panificação, através dos ensaios de reologia de *falling number* e alveografia com uso do produto obtido;

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo serão abordados conhecimentos inerentes a área interdisciplinar de biotecnologia e procurou-se investigar as diferentes características dos resíduos disponibilizados .

O capítulo trata também da apropriação do saber referente ao processo de fermentação e seus fatores de interferência, parâmetros de otimização do processo e tentativas de obtenção e purificação dos produtos obtidos. Todo este arcabouço visa criar uma visão integral dos desafios do processo de obtenção do produto biotecnológico desde a matéria-prima até o produto acabado.

2.1 - Obtenção de enzimas microbianas

A produção de enzimas de origem microbiana ocorre a partir substratos que disponibilizam nutrientes e são fontes de carbono em processo fermentativo. Os microrganismos de interesse industrial podem ser obtidos de várias fontes: podem ser isolados a partir de recursos naturais, adquiridos em coleções de culturas, obtidos a partir de mutantes naturais ou induzidos ou por técnicas de engenharia genética (Schmidell et al., 2001). O isolamento a partir de recursos naturais sempre foi uma atividade importante para a obtenção de novas linhagens, denominada prospecção microbiana, sendo realizada em resíduos agroindustriais ou através do solo aos quais os microrganismos já estão adaptados. A Figura 2.1 representa esquematicamente um processo geral fermentativo onde são evidenciados os quatro fatores que definem sua eficiência: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação dos produtos.

Os substratos mais utilizados para obtenção de bioprodutos são fontes de carbono de alta massa molecular que servem também de suporte, tais como celulose, amido, pectina e hemicelulose, entre outros. Tal composição está presente nos resíduos agroindustriais, por isso o grande interesse de pesquisadores nestes potenciais substratos para produtos

biotecnológicos. Para a produção de enzimas microbianas, são utilizados basicamente dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água do meio: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Esta última é definida como o processo no qual o crescimento microbiano se dá na superfície de materiais sólidos umedecidos, com ausência de água livre ou próximo dessa condição (Mudgett, 1986).

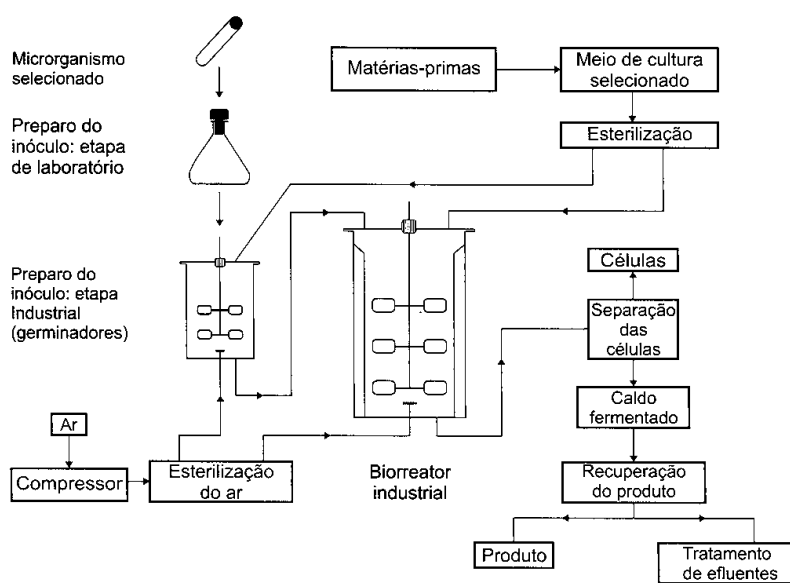


Figura 2.1 - Esquema geral de um processo fermentativo (Schmidell *et al.*, 2001).

A seguir descreve-se a composição de resíduos pesquisados para produção de produtos biotecnológicos.

2.1.1 – Substrato de resíduos de margarina

Atualmente, a margarina moderna é produzida com uma grande variedade de gorduras vegetais, geralmente misturadas com leite desnatado, sal e emulsionantes. Margarina é termo genérico para identificar gorduras alimentares de origem vegetal usadas em substituição da manteiga. O nome margarina vem de um óleo usado na sua formulação, chamado óleo margarina. Este óleo foi descoberto muito antes, em 1813, e ganhou este nome porque tinha a cor parecida com a das margarites, pérolas em grego (ABIMA, 2012).

A legislação brasileira RDC nº 270 de 22 de setembro de 2005 que aprova o regulamento técnico para óleos, gorduras e cremes vegetais define creme vegetal como alimento em forma de emulsão plástica, cremoso ou líquido, do tipo água/óleo, produzido a partir de óleos e/ou gorduras vegetais comestíveis, água e outros ingredientes contendo, no máximo 95% (m/m) e, no mínimo, 10% (m/m) de lipídios totais. Resíduos de sua fabricação são alvo de interesse em pesquisa de reaproveitamento por conter percentuais valorosos de ácidos graxos.

2.1.2 – Produção microbiana de enzimas usando óleos e derivados

A fabricação do produto margarina tem início na seleção de óleos vegetais líquidos e hidrogenados que podem ser de dendê, soja, semente de algodão, amendoim, milho ou girassol. Os outros componentes são a água e o leite em pó desnatado, o sal refinado, emulsificante e corante. As informações das etapas do processo de fabricação coletadas na unidade do Grupo M. Dias Branco são:

1-A fase oleosa preparada dos óleos desde seu estado cru, onde a neutralização visa separar e retirar os ácidos graxos livres. Logo após é realizada a filtragem e branqueamento, onde resíduos que permanecem na etapa anterior são retirados.

2-A seguir, os óleos são submetidos à desodorização, retirando-se quaisquer resquícios de odor e sabor. Uma pequena parte dos óleos é hidrogenada, ressalta-se que nem todas as margarinas passam pelo processo de hidrogenação. Nesta etapa são adicionados os ingredientes solúveis em óleo: corante, vitamina e emulsificante.

3-Na fase aquosa são adicionados o leite desnatado pasteurizado, o sal e outros componentes solúveis em água.

4- Por meio do seu batimento ocorre a mistura da duas preparações e resfriamento, assim, forma-se uma emulsão cremosa, que é adicionada nas embalagens plásticas.

No processo de obtenção da margarina observa-se a descrição de cinco etapas: neutralização, branqueamento, hidrogenação/esterificação, pós branqueamento e desodorização. Dentre elas, refino e desodorização produzem resíduos atualmente vendido para fábricas de sabões. As Figuras 2.2 e 2.3 descrevem em detalhes as duas etapas.

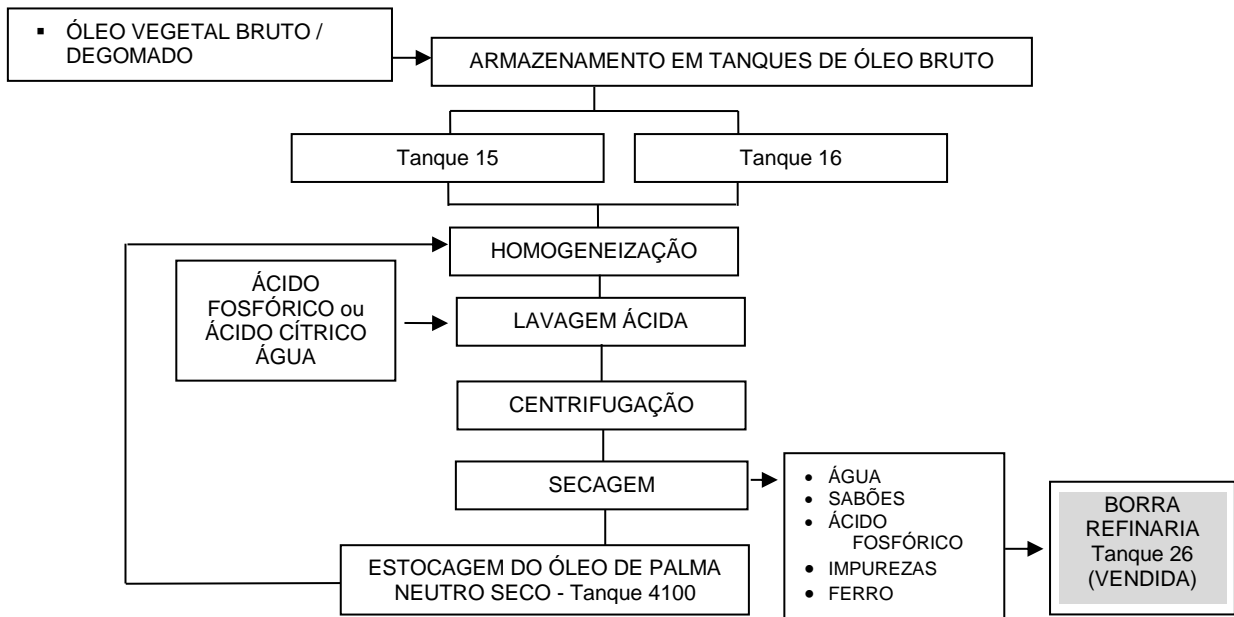


Figura 2.2 – Fluxograma do processo de refino de óleos da unidade de Gorduras e Margarinas Especiais – GME, localizada em Fortaleza /CE, ressaltando o resíduo da borra da refinaria vendido.

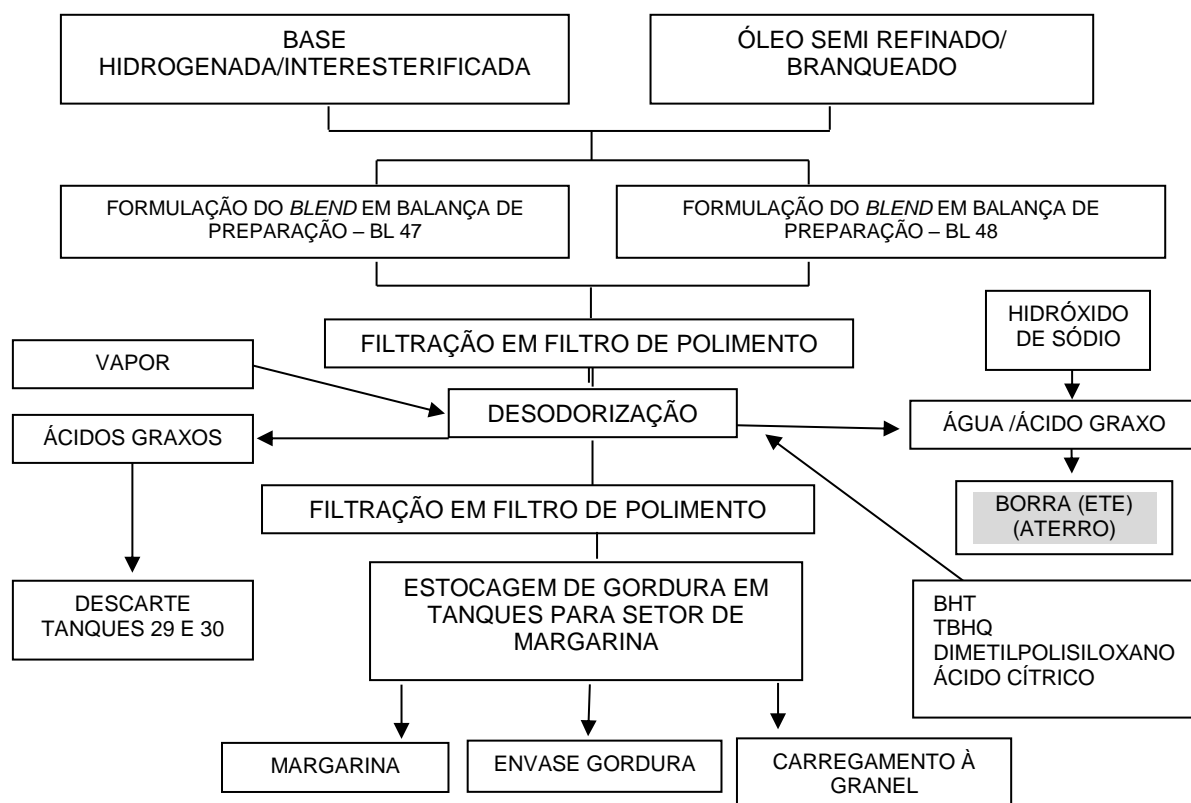


Figura 2.3. – Fluxograma do processo de desodorização, da unidade de Gorduras e Margarinas Especiais – GME, localizada em Fortaleza /CE, ressaltando o resíduo gerado da borra da ETE destinado ao aterro sanitário municipal.

O objetivo da desodorização apresentado na Figura 2.3 é remover ácidos graxos livres, componentes voláteis e produtos de decomposição térmica por destilação, em corrente de vapor, pressão reduzida e temperatura elevada. Tal etapa do processo produz o resíduo denominado borra da ETE que é enviado para destinação final em aterro sanitário municipal.

As Figuras 2.4 e 2.5 apresentam os locais de armazenagem dos resíduos: borra da refinaria e borra da ETE respectivamente.



Figura 2.4. - Armazenagem de borra da refinaria.



Figura 2.5. - Armazenagem de borra da ETE.

Para definição dos resíduos a serem investigados como possíveis substratos em fermentação, algumas características são citadas como imprescindíveis na literatura (Bennett, 1998; Dekker, 2003 e Farinas, 2011): serem baratos, atenderem as necessidades nutricionais do microrganismo, possuir características que facilitem o controle do processo, não provocar dificuldades na recuperação do produto, estabilidade para armazenagem, constância na composição e não constituir problemática ambiental no final do tratamento de efluentes.

2.1.3 - Lipases

As lipases codificadas como EC 3.1.1.3 são enzimas largamente disponíveis em animais, plantas e microrganismos e são responsáveis pela hidrólise das gorduras insolúveis, óleos e ésteres de ácidos graxos, resultando em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. A reação é considerada complexa apresentando uma fase não aquosa separada de emulsão, onde atua a enzima na interface gordura-água. A aplicação no processamento de óleos tem merecido maior atenção devido a possibilidade de hidrólise enzimática para produção de ácidos graxos, a síntese de lipídeos e a modificação enzimática dos lipídeos por interesterificação. A reação mais significativa para a indústria de alimentos envolvendo lipase trata-se da reação: triglicerídeo + água \rightarrow glicerol + ácidos graxos (Gupta, 2015)

Existem variadas origens de obtenção das lipases: animal (hepática pancreático e gástrica), microbiana (bacteriana, fúngica e de levedura) ou vegetal conforme Barros *et al.* (2010). Sendo que as lipases microbianas em escala industrial possuem limitações devido aos elevados custos de produção (Jaeger e Eggert, 2002; Jing *et al.*, 2003; Freire e Castilho, 2008; Gandra *et al.*, 2008; Leão, 2009; Leal, 2010; Ramos-Sanches, 2015). Descrevem-se abaixo algumas pesquisas realizadas sobre a produção de lipases.

Vieira (2005) pesquisou lipases isoladas como alternativa para conversão em ésteres, porém o alto custo e a rápida desativação enzimática na presença do álcool inviabilizava a produção comercial. Por isso a importância de se pesquisar novas alternativas e condições de processo para viabilização de obtenção do produto.

Rose e Pike (2006) determinaram a atividade lipolítica em resíduos de trigo e farelo de trigo em sua pesquisa utilizando-os como suporte para crescimento microbiano. A atividade da lipase em farelo de trigo variou de 2,17-9,42 UI/g, e em trigo grão inteiro 1,05-3,54 UI/g. As concentrações ideais de azeite e água utilizados como substrato foram 0,4-0,8 mL e 0,15-0,20 ml por g de amostra desengordurada, respectivamente. A incubação ideal de temperatura foi de 40 °C e tempos de incubação de até 8 h.

A lipase purificada do trigo caracterizada com (143 ± 2 KDa) utilizada no substrato de trioleína com aplicações em reações de esterificação e hidrólise, mostrou atividade ótima em pH alcalino próximo a 8,0 e temperatura de 37°C. A enzima manteve 20% da sua atividade após a incubação a temperaturas de 60 a 90 °C, durante uma hora a pH 8,0 Jing *et al.*(2003).

Colla *et al.* (2015) pesquisaram a estabilidade de lipases produzidas por fermentação do fungo *Aspergillus* em estado sólido e por fermentação submersa e concluíram serem 80% mais estáveis por 1h a 90° C as lipases produzidas em fermentação em estado sólido.

2.1.4 - Microrganismos produtores de Lipases

Oliveira *et al.*, (2008) avaliaram produção e caracterização de lipase produzida por *Fusarium* sp. e sua aplicação na produção de biodiesel concluindo que a lipase obtida da cepa selvagem de *Fusarium* sp. apresentou potencial para utilização industrial, podendo atuar no processo de produção de biodiesel, devido a sua alta estabilidade na presença de metanol e boa atividade de transesterificação. A mesma poderia ser utilizada como biocatalisador de baixo custo para produção de biodiesel a partir de óleo de soja e que inconvenientes envolvidos no processo químico podem ser evitadas com a utilização da enzima, podendo essa ser aplicada na indústria de detergentes devido à manutenção da atividade em meio altamente alcalino. Considerou-se que a cepa de *Fusarium* sp. isolada apresentou alta atividade em tempo inferior aos encontrados na literatura, alcançando 120h de cultivo (Maia *et al.*, 2001). Além de ser uma enzima com potencial uso industrial, produzida por um microrganismo representante da biodiversidade nacional.

Apresentando atividade máxima de 2,5 U/mL em 96 h foram descritas na literatura lipases com atividades de 1,19 U/mL em cultivos com *Fusarium* sp. (Mase *et al.*, 1995), 0,5 U/mL com *F. solani* (Maia *et al.*, 2001) e 1,7 U/mL com *F. oxysporum* (Camargo-de-Moraes *et al.*,2003). Goujard *et al.* (2009), utilizando lípases comerciais de *Candida antarctica* e *Rhizopus arrhizus* obtiveram, respectivamente, 560 e 16 UI/g.

Fregolente *et al.* (2009), pesquisando a produção de monoglicerídeos via glicerólise enzimática e destilação molecular fizeram uso de lipase comercial de *Candida antarctica* B (Novozym 435) imobilizada cedida pela Novozymes. Industrialmente, monoacilglicerídeos (MAG) e diacilglicerídeos (DAG) são produzidos através da interesterificação de triacilgliceróis com glicerol (glicerólise), a altas temperaturas (>200 °C), na presença de catalisadores inorgânicos. Esta reação produz uma mistura com, aproximadamente, 50% de MAG. Devido às altas temperaturas utilizadas, esta reação é acompanhada pela formação de subprodutos indesejáveis, decorrentes de reações de polimerização de ácidos graxos. Estes componentes conferem cor escura e odor desagradável ao óleo. Com o crescente interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, ou seja, produtos livres de reações de polimerização e de gorduras na configuração *trans*, a substituição da rota química pela rota enzimática na produção de MAG e DAG apresenta-se como uma alternativa atrativa. Neste processo são utilizadas condições amenas de temperatura (40-70 °C), não havendo reações paralelas de polimerização e alterações *trans* nas moléculas produzidas. Além disso, no processo enzimático é possível explorar a seletividade das enzimas em relação aos ácidos graxos e sua regioseletividade pela posição do ácido graxo na molécula de glicerol (posição α ou β). Verificado que dentre as lipases estudadas, a lipase de *Candida antarctica* B obteve melhor desempenho na produção de DAG e MAG.

Pandey (2000), investigando isolamento e caracterização de três diferentes tipos de lipases por fermentação semi-sólida utilizando *Candida rugosa*, comenta que a produção também ocorre por *Geotrichum candidum*, *C. antarctica*, *C. rugosa*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium cyclopium*, *Rhizopus miehei* e bactérias como *Chromobacterium viscosum*. Contudo, a lipase produzida por *C. rugosa* tem se tornado um grande diferencial dentro da diversidade biotecnológica.

Nwuche e Ogbonna (2011) tiveram como objetivo isolar e caracterizar microrganismos produtores de lipases, provenientes de diferentes efluentes de indústrias alimentícias da região de Pelotas, RS., como importantes em aplicações industriais. Foram isoladas 21 bactérias, identificadas como *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica* e *Raoultella planticola*. Os fungos filamentosos isolados foram caracterizados aos gêneros *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma* sp.. A produção

de lipase extracelular foi observada em 71,43% das bactérias e 57,14% dos fungos. A bactéria que apresentou atividade enzimática mais promissora foi a *E. aerogenes* (1,54 U/mL), entretanto, entre os fungos, não houve diferença significativa entre os quatro isolados.

Barros *et al.* (2010) discutiram a importância da enzima lipase sob o ponto de vista da eficiência catalítica tornando-se comercialmente viável e demonstrando sua versatilidade na hidrólise, principalmente, na troca de grupos funcionais por esterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. Discute que pesquisadores têm investigado lipase de semente no auge de sua atividade durante a germinação dos grãos, correspondendo a enzima de 20 a 50% do peso da semente. Com algumas exceções, as lipases oleaginosas são geralmente mais ativas, especificamente, com triacilgliceróis de cadeia curta que contêm ácidos graxos.

Treichel *et al.* (2010); Griebeler *et al.* (2011); Musa *et al.* (2012) e, Narasimhan e Bhimba (2015) descreveram o isolamento e seleção de microrganismos utilizando a mesma estratégia adicionando apenas 1,0 g da amostra a placa estéril de ágar batata dextrose (PDA) com aplicação ou não de antibiótico para evitar crescimento bacteriano, incubadas a 37 °C de 2 a 4 dias, reinoculados sucessivamente para isolamento da microbiota alvo, armazenando as cepas isoladas a 4 °C e enviando para identificação.

2.1.5 – Farelo de trigo

Trigo (*Triticum aestivum*) é uma gramínea que cultivada em todo mundo, representando a segunda-maior cultura de cereais depois do milho. O grão de trigo é um alimento básico usado para fazer farinha e, com esta, diversos alimentos, como pães, biscoitos e macarrão. As mudanças na composição do trigo se dão em sua maioria devido às diferenças entre as condições de solo e de clima das diversas regiões onde o grão é plantado (Certrem, 2004). O grão de trigo, representado na Figura 2.6, contém em sua composição cerca de 70% de carboidratos. Além da presença de carboidratos complexos, nutrientes importantes para uma alimentação saudável. O grão é composto por proteínas, vitaminas do complexo B e outras, minerais, ácidos graxos essenciais e fibras alimentares (Wynn *et al.*, 1979; Garza e Woodruff, 1996; Bacha, 2006). A fibra ou farelo de trigo é a película externa da parte comestível do grão de trigo, que não é digerida pelo organismo humano. Na sua composição

são encontrados diversos minerais, inclusive o cromo, que possui funções na manutenção do metabolismo dos carboidratos e gorduras (Pagnussatt *et al.*, 2011; Segs, 2011; Felix, 2014). O farelo de trigo tem, segundo os autores acima, uma composição percentual média de celulose de (31%), hemicelulose (26%), lignina (24%) e cinzas (7%). A Figura 2.6 apresenta as partes do trigo: farelo, pêlos, endosperma e germe, como também a estrutura química complexa da xilana do trigo que deverá ser consumida pelo microrganismo no processo fermentativo para produção da xilanase.

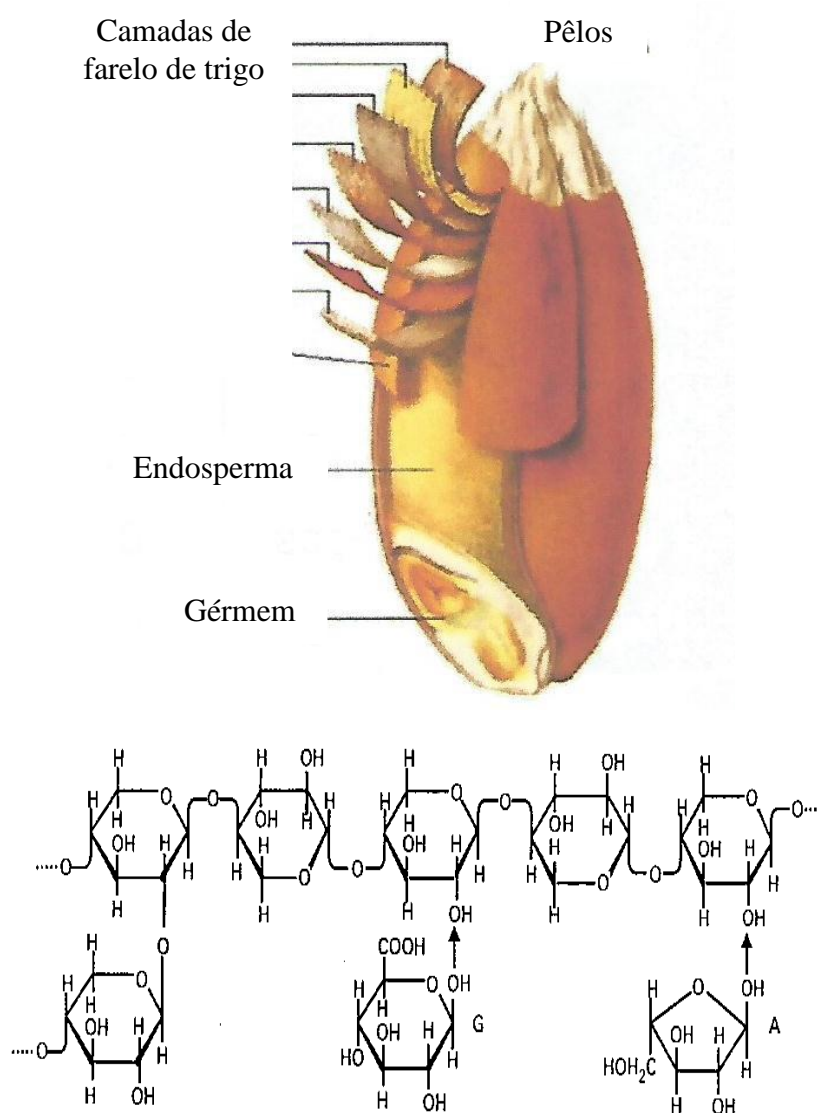


Figura 2.6- Esquema da estrutura do grão de trigo e estrutura química da xilana do trigo, (Fonte Scheuer *et al.*, 2011).

Castro (2010), pesquisando a produção, propriedades e aplicação de celulase na hidrólise de resíduos agroindustriais cita palha de trigo, resultante da moagem do trigo (*Triticum aestivum*), como fonte celulósica na produção de celulases por microrganismos, provando assim sua viabilidade. Comenta também que a empresa Canadense Logen Corporation sediada em Ottawa, líder mundial na produção de etanol de celulose recebeu financiamento para desenvolvimento de tecnologia na produção de etanol com palha de trigo, cevada, aveia e talo de milho. Com a construção da primeira unidade semi-industrial de etanol de biomassa consumindo 40 ton/dia de palha de trigo. Comprovando a utilização deste resíduo e sua viabilidade em larga escala.

Na Figura 2.7 pode-se observar a estrutura química da hemicelulose. As pontes de ligação do oxigênio que necessitam ser hidrolisadas pelas enzimas para dar origem aos produtos de valor agregado comercial xilose, arabinose, galactose, manose e ácido acético são evidenciadas por setas e pode-se visualizar onde ocorrem as quebras estruturais. Tal figura elucida a estratégia de quebra enzimática da hemicelulose apresentando seus subprodutos mais numerosos pentoses e hexoses.

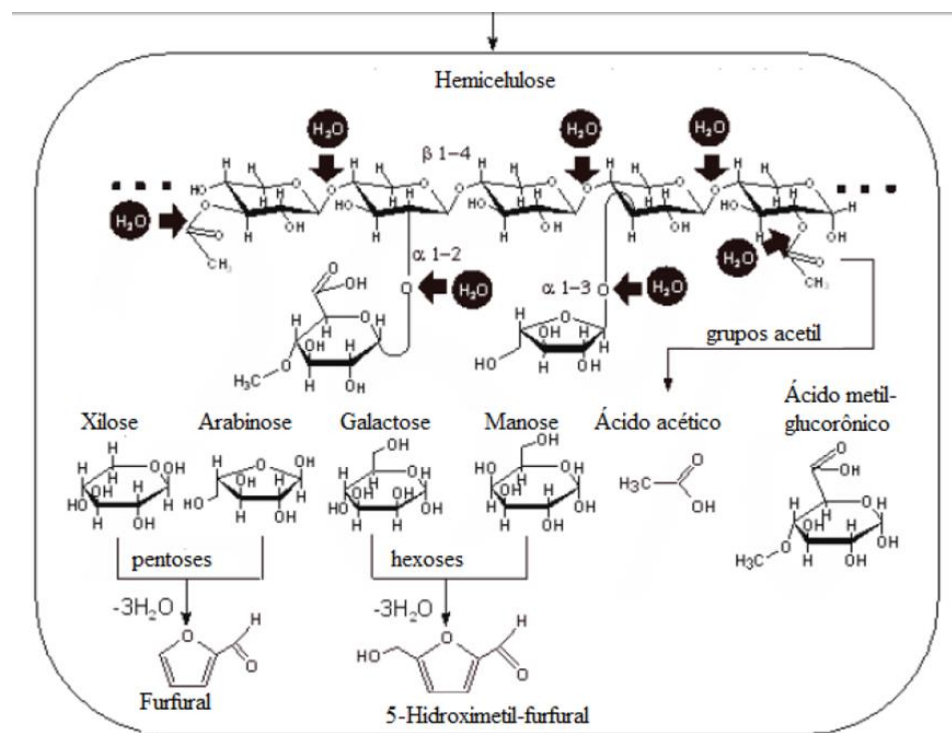


Figura 2.7 - Desestruturação química para formação da xilose. Fonte: Marton *et al.*,(2006).

Na Tabela 2.1 apresenta-se pesquisas realizadas referenciando o percentual de celulose, hemicelulose e lignina em palha/farelo de trigo, parâmetros estes imprescindíveis de avaliação da caracterização dos substratos que nortearam a avaliação da necessidade de pré-tratamentos ou sua tipificação.

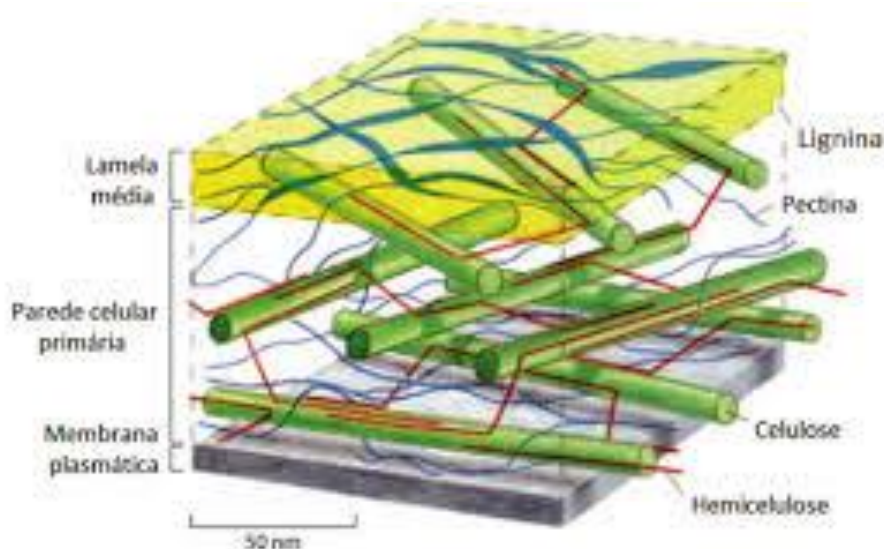
Tabela 2.1 – Caracterização da palha/farelo de trigo por diferentes autores.

Produto/Autor	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
Farelo de trigo, Kuhad e Singh (1993)	30	24	18	10
Farelo de trigo Castro (2010)	39	36	10	–
Farelo de trigo, Scheuer <i>et al.</i> (2011)	31	26	24	7
Farelo de trigo Azarias <i>et al.</i> (2012)	10,86	28,88	4,89	–
Palha de trigo Lameira (2013)	30	50	15	-

Observa-se que o percentual de maior proporção é, em geral, a celulose, segundo a hemicelulose e por último a lignina. Mesmo presente em quantidades menores em relação a fração celulósica a lignina confere segundo Castro (2010), uma limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente a atuação microbiana sobre o material.

Diferenças entre celulose e hemicelulose segundo Lameira (2013) consistem respectivamente em: unidades de glicose ligadas entre si na celulose e consiste em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si na hemicelulose. Alto grau de polimerização (1000 a 15000 monômeros) com formação de arranjo fibroso com regiões cristalinas e amorfas na celulose e baixo grau de polimerização (50 a 300 monômeros) sem arranjo fibroso com somente regiões amorfas na hemicelulose. A celulose é degradada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente e insolúvel em álcalis, enquanto a hemicelulose é degradada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente e solúvel em álcalis. Segue abaixo a estruturação deste componentes na planta. A Figura 2.8 mostra o grau de dificuldade

enfrentado pelos microrganismos em acessarem a hemicelulose como fonte de carbono nos complexos lignocelulósicos.



2.8 Figura – Complexo lignocelulósico. (Fonte: Santos *et al.*, 2012)

2.1.6 – Obtenção de Bioprodutos utilizando farelo de trigo e derivados

Conforme literatura para FES, o substrato por princípio é considerado o suporte sólido que em geral atua também como fonte de nutrientes, aparecendo inúmeras vezes o farelo de trigo como substrato para produção de enzimas (Pandey, 1991; Srinivas *et al.*, 1994; Ghildyal *et al.*, 1994; Jaleel *et al.*, 1992; Kar, 2006; Goyal, 2008; Joshi, 2012; Jaekel, 2012 e Isil; e Nilufer, 2014).

Dorado *et al.* (2009), pesquisando a fermentação em estado sólido de casca de soja suplementado com farelo de trigo usando uma co-cultura de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, concluíram que o tratamento alcalino gera açúcares com concentração mais elevada em comparação com o pré-tratamento ácido. Isto deveu-se a remoção de lignina e da concentração da fração celulósica. O trabalho mostrou que a fermentação em estado sólido em

biorreator do tipo bandeja estático é uma valiosa estratégia para produção de um sistema de enzimas com atividades equilibradas que pode eficientemente utilizar biomassa lignocelulósica como palha de trigo. Registrou o valor da proteína (N x5,75) de 12,3% para farelo livre de farinha de trigo.

Segundo Gomes (2010) a adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. As enzimas termoestáveis já têm sido usadas como aditivo de detergentes e sabões (proteases e celulasas), no processamento industrial do amido (α -amilase, glucose isomerase) e na indústria de polpa e papel (xilanase) e surgem como alternativas de interesse em outros bioprocessos, como o de síntese orgânica (lipases, proteases, oxidoredutases), no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal. Andrade (1996) pesquisando o microrganismo termófilo *Pyrodictiales abyssi* relata também a produção de xilanase com temperatura ótima de 97°C.

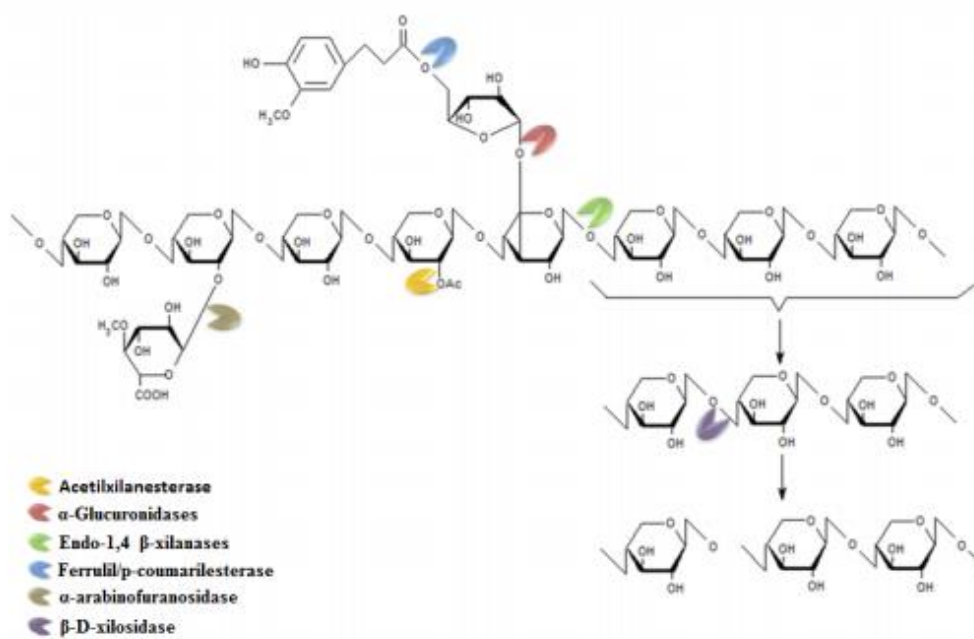
2.1.7 - Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são classes de enzimas produzidas por diversos microrganismos com substratos lignocelulósicos que degradam o polissacarídeo, abundante da natureza de proteção das plantas, beta-1,4- xilano em xilose, decompondo assim a hemicelulose.

A Figura 2.9 mostra a estrutura heterogênea das hemiceluloses que necessita não apenas da ação de uma enzima, mas de um complexo enzimático, incluindo aquelas que atuam nas cadeias laterais dos polímeros (Rosa, 2014). Assim sendo o complexo é composto por: Endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) que hidrolisam as ligações β -1,4 da cadeia principal de resíduos de xilose; 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) que catalisam a hidrólise da xilobiose e de alguns 1,4- β -D-xilooligossacarídeos a partir da extremidade não redutora; α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) que hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais; α -glucuronidases (EC 3.2.1.1) requeridas para a hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glucurônico ou sua ligação 4-O-metil-éster; acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) que hidrolisam as ligações entre xilose, ácido acético e ácido ferúlico; p-coumárico esterases

(EC 3.1.1) que removem ácidos pirúvico e cumárico dos resíduos de arabinose das cadeias laterais.

sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil.



2.9 Figura – Atividade de um complexo lignocelulósico. Fonte adaptada Polizeli,(2009).

As endoxilanases (β -1,4-xilanases ou endoxilanases) catalisam a hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilósídicas de maneira aleatória, liberando xilobiose e outros xilo-oligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo. As β -xilósidas podem ter afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos. Essas enzimas catalisam a clivagem de xilobiose e atacam extremidades não redutoras em xilo-oligossacarídeos, liberando xilose. As β -xilósidas são importantes na degradação da xilana, pois removem produtos finais que poderiam inibir as endoxilanases e, com isso, limitar a hidrólise do polissacarídeo (BIELY, 1985).

Tendo em vista a habilidade dos microrganismos para hidrolisar hemicelulose pensou-se na possibilidade de obtenção de xilanases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, uma vez que a farinha de trigo é fabricada em grande escala em várias regiões do Brasil. O

interesse na obtenção de enzimas xilanásicas, utilizando FES, residiu no fato de que este processo apresenta algumas vantagens econômicas em comparação a fermentação submersa (FS), sendo relacionadas principalmente com a diminuição de energia requerida.

Encontram-se relatos da fermentação da xilose para obtenção de etanol patenteada pela Universidade da Flórida utilizando cepa da *E. coli*, geneticamente modificada. A cepa de *E. coli* foi modificada pela adição de genes necessários para fermentar os açúcares, com a piruvato descarboxilase e a enzima álcool desidrogenase proveniente da bactéria *Ziymomonas mobilis*, alcançando um rendimento na fermentação de 95% do teórico em escala de bancada. Porém, em reatores piloto a presença de compostos acumulados durante a fermentação inibem o crescimento microbiano reduzindo consideravelmente o rendimento. O trabalho confirma ainda, que o fungo *Trichoderma reesei* hidrolisa a celulose, contudo não atinge a hemicelulose (xilose, arabinose, entre outras). Neste aspecto outros microrganismos vêm sendo experimentados, como *Acidotherrnus cellulolyticus*, sem que seja atingida a mesma eficiência. A principal limitação do processo de produção de etanol lignocelulósico é que este, quando conduzido com microrganismos clássicos de fermentação alcoólica, demandam a etapa de hidrólise enzimática e as enzimas ainda têm custo elevado, especificamente no Brasil.

Para produzir um galão de etanol é gasto US\$1,20 só com enzimas em períodos de até sete dias, um desafio a ser vencido pelos pesquisadores (Isil e Nifuler, 2005; Kar, 2006; Andrade, 2009; Joshi, 2012).

Na Tabela 2.2 apresentam-se algumas condições de produção da xilanase e técnicas de purificação pesquisadas.

Tabela 2.2 Diferentes estudos para produção de xilanases.

Microrganismos Produtores	Substratos Utilizados	Condições de Cultivo pH e T (°C)	Técnicas de Purificação	Autor(es)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Xilana, p-nitrofenol beta D-xilopiranosídico e p nitrofenol beta-D celobiosídico	pH 4,5; 60 e 70 °C	Precipitação por sulfato de amônio, diálise, cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica	Decelle <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus thermantarcticus</i>	Xilana	pH 5,6; 80 °C	Filtração em gel	Lama <i>et al.</i> , 2004
<i>Thermotoga maritima</i>	Xilana e xilooligossacarídeo	pH 6,1; 50 °C	Enzima recombinante, Cromatografia por afinidade	Jiang <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	Xilana	pH 5,6; 38 °C	Precipitação por sulfato de amônio e cromatografia por interação hidrofóbica	Cepeljnik <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus sp.</i>	Xilana	pH 6,5; 8,5; 10,5; 50 °C	Precipitação de sulfato de amônio, diálise, cromatografia troca iônica e filtração em gel	Sapre <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus versicolor</i>	Xilana	pH 6,0-7,0; 55 °C	Diálise, cromatografia de troca iônica, osmose reversa	Carmona <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus caespitosus</i>	Xilana e polpa kraft	pH 5,5-6,5 ; 6,5-7,0; 50 °C	Filtração em gel	Sandrim <i>et al.</i> , 2005
<i>Penicillium citrinum</i>	Xilana	pH 5,0; 55 °C	Cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Tanaka <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Xilana	pH 5,0; 55 °C	Cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Krisana <i>et al.</i> , 2005
<i>Schizophyllum commune</i>	Glucuronaxilana e ácido aldotetraurônico	pH 5,5; 50 °C	Cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Kolenová <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Xilana	pH 5,0; 50°C	Enzima recombinante, filtração em gel	Levasseur <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus SP 2M1</i>	xilana comercial tipo "birchwood"	pH 6,0 ; 28-38° C	Filtração em gel	Cabarello, 2005

Fonte: (Santos, 2010)

Pereira (2013) estudando a função da parede celular, composta de lignina, hemicelulose e celulose, em proteger dos microrganismos e estresse oxidativo à célula, descreveu a xilana como argamassa que une a lignina e a celulose para formação desta estrutura de proteção. Afirma que a formação de xilanases é reprimida pela presença de glicose e induzida pela xilana, fonte alternativa de carbono utilizada pelos microrganismos na sua estratégia de sobrevivência.

Quando na presença de xilana o microrganismo é induzido a produzir xilanases para início do consumo da fonte de carbono. Na liberação de glicose facilmente consumível ocorre uma segunda etapa onde a repressão catabólica comunica ao microrganismo a necessidade de iniciar um novo mecanismo priorizando agora o crescimento celular. O fenômeno da repressão catabólica é explicado pela capacidade da célula em reconhecer a molécula sinalizadora, a glicose, que atravessa a membrana celular e ativa a molécula repressora, que se liga a região promotora dos genes da celulase e xilanase bloqueando a transcrição destes genes.

O uso de xilanase só foi introduzido na panificação nos anos 70 com resultados de acréscimos entre 14 e 60% no volume específico comparado com pães não suplementados. Investigando biomassa do cerrado encontraram atividade xilanolítica de 35,5 UI/mL com pH ótimo de 5,0 e temperatura de 50°C. Em 3 dias de cultivo o microrganismo identificado como *Aspergillus niger* IFBMD01 alcançou o pico de produção de xilanase utilizando como substrato farelo de trigo em fermentação submersa. A massa molecular identificada em bandas protéicas foi de 30 a 66 kDa.

Silva (2014) pesquisou a produção de xilanase em fermentação submersa pelo fungo *Emericella nidulans* cultivado em bagaço de cana de açúcar. Obteve resultado a partir do primeiro dia de fermentação obtendo xilanase de 22 KDa após purificação por ultrafiltração do extrato bruto, precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel de troca iônica. Comenta sobre a utilização de xilanases na produção de pães e sucos e que o ácido 4-hidroxi-benzóico aumentou sua atividade. A enzima obtida denominada pela sigla “XynA” apresentou maior atividade a 55°C e na faixa de pH 3,0 – 6,5. A enzima se mostrou pouco termoestável, com meia-vida de 40, 10 e 7 minutos a 28, 50 e 55°C, respectivamente. “XynA” foi mais ativa sobre a porção solúvel da xilana, com valores de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ 3,39 mg/mL e 0,502 UI/mL, respectivamente. A hidrólise da xilana por “XynA” gerou xilooligossacarídeos, indicando ação tipo endo. Diferentes compostos fenólicos comumente

liberados durante o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica causaram efeitos variados sobre “XynA”. Os ácidos tânico e cinâmico inibiram a enzima, enquanto o ácido 4-hidróxi-benzóico aumentou sua atividade e os ácidos ferúlico, p-cumárico e vanilina não mostraram efeito. O etanol aumentou a atividade, estabilidade e velocidade máxima da enzima, indicando potencial para aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneas de biomassa. O ultrafiltrado (uma fração semipurificada de xilanases) foi capaz de hidrolisar polpas de celulose em diferentes etapas do processo *Kraft*, resultando na liberação de açúcares redutores, cromóforos, pentoses e produtos de hidrólise de xilana, sem concomitante liberação de glicose. O extrato bruto se mostrou capaz de degradar bagaço de cana-de-açúcar não-tratado ou submetido a explosão à vapor, liberando açúcares redutores e produtos de hidrólise de xilana.

Umsza-Guez *et al.* (2011) investigando a produção de xilanase por *Aspergillus awamori* e fermentação em estado sólido com substrato em polpa de tomate mensuraram no primeiro dia de cultivo valores entre 80 e 100 IU/gds (unidade de medida internacional de atividade enzimática por grama de resíduo sólido). Sendo a xilanase a enzima produzida nas condições ótimas de pH 5,0 e temperatura de 50°C. Enzima ativada pelo ion Mg^{2+} e fortemente inibida por Hg^{2+} e Cu^{2+} . Na extração a atividade foi preservada em pH entre 3,0 e 10,0 e temperaturas entre 30 e 40°C.

Delabona (2015) explica que as enzimas microbianas podem ser obtidas por cultivo em substratos sólidos, também conhecida por fermentação em estado sólido (FES), em que se pode utilizar diversos substratos como suportes ou podem ser obtidas por fermentação submersa (FS), cuja definição é de que o meio de cultura, apresenta alto teor de água. Nos processos submersos as fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente podendo ter grandes volumes.

Existem muitos tipos de biorreatores disponíveis para a FS, mas a produção de enzimas comerciais é feita predominantemente em sistemas de mistura por agitadores mecânicos internos, dentro de um recipiente cilíndrico fechado constituído de aço inoxidável e contendo um eixo interno com pás para agitação e o controle é feito por dispositivos acoplados.

Os processos com cultivo submerso apresentam variações na forma de condução, podendo operar de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. No regime contínuo o meio é adicionado de forma contínua e os produtos de fermentação também são continuamente removidos. Já os processos descontínuos podem ser realizados na forma de batelada, isto é quantidades únicas de substrato são fornecidas ao microrganismo no início do cultivo descontínuo; e de forma batelada alimentada *fed batch*, em que ocorre a alimentação durante o processo. No processo semi-contínuo a adição de substrato e retirada de produto são efetuadas intermitentemente. O processo de fermentação em *fed batch* envolve uma adição lenta de meios com nutrientes, assim pode permitir níveis de nutrientes baixos para minimizar a repressão por metabólitos.

Estudos têm mostrado que essa forma de fermentação diminui os problemas associados à aeração, agitação, formação de espuma e incrementam a produção das enzimas (Esterbauer *et al.*, 1991). Portanto, o cultivo submerso de fungos é considerado um processo multicomponente, onde o crescimento celular e a formação de produto são influenciados pelos parâmetros operacionais que envolvem a fermentação: composição de meio de cultura, temperatura, pH do meio, força de cisalhamento, morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores, agitação do meio reacional, configuração dos impelidores, quantidade de oxigênio dissolvido, entre outros. E a produção em larga escala de enzimas requer interdisciplinaridade.

Enzimas xilanolíticas são produzidas por diversos organismos, como, bactérias aeróbias e anaeróbias, leveduras, fungos mesofílicos, termofílicos e extremofílicos, algas marinhas, protozoários, moluscos, crustáceos, insetos, sementes, entre outros. A maioria dos microrganismos, que utilizam substratos contendo xilano, produzem xilanases, pois apresentam um conjunto de genes que são expressos em resposta à presença de determinados substratos. Dependendo do organismo, as enzimas podem permanecer no interior da célula, na membrana celular ou ser secretada para fora da célula, para o meio extracelular. Os fungos filamentosos são os principais produtores de xilanases, uma vez que secretam as enzimas para o meio externo, em níveis muito mais elevados do que os de leveduras e bactérias. A regulação da produção do complexo xilanolítico pode ser independente da expressão de outras enzimas; durante o crescimento em xilano, os fungos filamentosos produzem xilanases e pouca ou nenhuma quantidade de celulase. Porém, na presença de celulose os organismos

produzem celulasas associadas à xilanases. As xilanases são, geralmente, enzimas induzíveis, porém a produção constitutiva de xilanase também tem sido verificada.

Os fungos filamentosos possuem uma grande diversidade de mecanismos de controle celular. Os mecanismos que regulam a formação de enzimas extracelulares, com base na fonte de carbono presente no meio, são influenciados pela disponibilidade de precursores para a síntese de xilanases. A molécula de xilano, por ser uma estrutura polimérica, não é capaz de penetrar na célula microbiana, então, geralmente, fragmentos menores, xilooligossacarídeos de baixa massa molecular, são formados pela ação de pequenas quantidades de xilanases constitutivas secretadas no meio extracelular; estes oligossacarídeos são transportados para dentro da célula, por permeases, e induzem a expressão dos genes envolvidos na síntese de xilanases. A xilose e alguns xilooligossacarídeos são indutores da produção de xilanase, mas geralmente, os açúcares prontamente metabolizáveis, tais como a glicose, atuam como repressores da síntese de xilanase.

A repressão catabólica por glicose é um fenômeno comum observado na biossíntese de xilanase. A indução de xilanase em fungos filamentosos é um fenômeno complexo e o nível de resposta varia para cada micro-organismo.

Um substrato que induz a produção de xilanase em uma espécie pode ser um inibidor da produção em outra espécie. A produção de xilanase pode ser induzida também por materiais lignocelulósicos como farelo de trigo, palha de arroz, sabugo de milho e bagaço de cana. Xilanases, produzidas por micro-organismos, tem sido amplamente utilizadas durante as últimas décadas, por causa de suas potenciais aplicações em diversos setores da indústria. *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma koningii*, dentre outras espécies, tem sido manipuladas para a produção de xilanases comerciais (Collins *et al.*, 2005). O mesmo autor estudando cultivos utilizando farelo de trigo, farelo de aveia e bagaço de cana, com produção de xilanase pela linhagem de *P. chrysogenum* e *Aspergillus versicolor*, cultivadas em condições estáticas a 28 °C, por sete dias em frasco Erlenmeyer de 125 mL em meio líquido Vogel, pH 6,5, contendo 1% (m/v) de cada substrato como única fonte de carbono encontrou uma atividade de 3,59 U/mL, cerca de 25 vezes maior que em cultivo com glicose (0,15 U/mL). Sugerindo que a enzima é de indução, podendo também sofrer repressão catabólica pela glicose. Em cultivos com farelo de aveia, observou maior produção de xilanase com

valor médio de 4,56 U/mL, enquanto que em farelo de trigo a atividade foi de 1,63 U/mL. Esse resultado é importante já que a produção de xilanases em resíduos agroindustriais contribui para a redução do custo de produção dessas enzimas, podendo viabilizar um processo em maior escala. Dentre os resíduos agroindustriais, o cultivo com bagaço de cana-de-açúcar se destacou por apresentar a maior atividade específica com valor de 8,75 U/mg de proteína, fator interessante para o uso desse substrato para produção seguida de purificação das xilanases. *Aspergillus versicolor* apresentou maior produção de xilanase em cultivo com farelo de trigo.

Cunha (2016) estudando a purificação e caracterização bioquímica e biofísica de uma xilanase (Xyl) de *Aspergillus foetidus* crescido por 7 dias em casca de soja, purificam e caracterizam visando o potencial biotecnológico da Xyl e o aproveitamento do resíduo. A curva de indução enzimática do fungo indicou alta atividade de xilanase a partir do segundo dia, mantendo-se constante ao longo de 20 dias. A otimização das condições de cultivo, utilizando a metodologia de superfície resposta, levou a produção máxima de xilanase de 13,98 U/mL. Uma xilanase foi purificada com massa molecular estimada de 14,19 kDa. A Xyl teve sua maior atividade a 50°C e pH 5,0. A meia-vida da Xyl a 30°C e a 50°C foi de 8 dias 16 horas e 7h 36min, respectivamente. A enzima foi ativada por Mg^{+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} e Na^{+} e inibida por Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e SDS.

Os produtos da hidrólise da xilana liberados induzem a produção de xilanases por diferentes métodos. A xilose, por ser uma pequena molécula de pentose, facilmente entra nas células de bactérias e fungos e induz a produção de xilanases. A indução pelas moléculas maiores pode ser explicada pela transposição direta na matriz celular onde essas moléculas são degradadas por β -xilosidases intracelulares liberando os resíduos de xilose. Outra possibilidade é que esses oligômeros são hidrolisados em monômeros durante o processo de transposição da membrana celular para a matriz celular pela ação de transportadores hidrolíticos capazes de clivar a ligação β -1,4.

Um fenômeno bem reportado na literatura é a repressão catabólica por glicose na biossíntese de xilanase. Se esse açúcar está presente no meio, observa-se a repressão da síntese de enzimas catabólicas que pode acontecer pela repressão direta do gene de transcrição e indiretamente pela repressão do ativador transcricional. A síntese da enzima também é

reprimida na presença de fontes de carbono facilmente metabolizadas, sugerindo que a síntese da enzima é controlada por reguladores no estado de transição e repressão catabólica.

Terrone (2013) realizou trabalho com uma linhagem de *Penicillium chrysogenum* para produzir xilanases utilizando um resíduo agroindustrial como substrato. O principal objetivo foi melhorar a produção da xilanase, verificando a influência de diferentes substratos, agitação, pH e temperatura de cultivo.

As propriedades da enzima bruta e da purificada foram pH ótimo de 6,0 e 6,5, respectivamente, e a temperatura ótima para ambas de foi a 45 °C. As meias vidas a 40, 45, 50, 55 e 60 °C, para a xilanase bruta foram de 37, 28, 16, 2, e 1 minuto e para a xilanase purificada foram de 35, 31, 10, 3 e 2 minutos, respectivamente. A maior estabilidade ao pH da enzima bruta ocorreu em pH 6,0 e também se mostrou estável na região alcalina, entre 8,0 e 10,0; já a enzima purificada apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 10,0. A atividade xilanase, presente no filtrado bruto e da enzima purificada, sofreu inibição na presença de alguns íons metálicos, como Cu⁺² e Pb⁺² e teve sua atividade aumentada na presença de agentes redutores como DTT e β-mercaptoetanol.

Dutra (2013). Relatou que *Chrysosporthe cubensis*, fungo patógeno de eucalipto, possui potencial para produção de enzimas para a sacarificação da biomassa lignocelulósica. Neste estudo o fungo foi cultivado em diversas fontes de carbono sob condições submersas, a fim de observar a produção de celulasas e hemicelulasas extracelulares. Foram testados como indutores de atividade enzimática fontes de carbono complexas como farelo de trigo, carboximetilcelulose – CMC, xilana Birchwood – XB, *Locust bean gum* – LBG, pectina de citrus peel – CP e também fontes de carbono mais simples como glicose, celobiose, lactose, galactose, manose, xilose e arabinose. *C. cubensis* produziu os maiores níveis de atividades celulolíticas e hemicelulolíticas quando crescido em farelo de trigo e CMC. Quando cultivado em farelo de trigo *C. cubensis* produziu as atividades β-glicosidase, endoglicanase e xilanase de 0,36 U/mL, 3,6 U/mL, 14,2 U/mL, respectivamente.

Os extratos produzidos por *C. cubensis* cultivados em presença de fontes de carbono simples, apesar de não apresentarem, quantitativamente, valores expressivos de atividade de celulasas e hemicelulasas, apresentaram, de maneira qualitativa, atividades de celulasas e hemicelulasas quando analisados através de zimogramas. Isto comprova que fontes de

carbono simples podem estar envolvidas na ativação da produção tanto de celulases quanto de hemicelulases em *C. cubensis*.

No processo de indução de celulases e hemicelulases em fungos, na visão geral, os processos de produção de celulases e hemicelulases variam sobremaneira quando se comparam diferentes organismos. Em bactérias como *Clostridium thermocellum*, *Cellulomonas flavigena* e *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa*, a expressão de celulases ocorre de maneira constitutiva, enquanto que em fungos, há um complexo mecanismo de regulação da expressão destas enzimas (Suto e Tomito, 2001). Nos fungos existem basicamente três estados na regulação de celulases e hemicelulases: a expressão em nível basal, a produção induzida por indutores e a repressão catabólica por carbono. A expressão em nível basal ocorre quando não há ligação de proteínas ativadoras, nem de proteínas repressoras, às regiões reguladoras dos genes. Nestas condições, os genes são transcritos em uma pequena extensão, conferindo a expressão basal de celulases e hemicelulases pelo fungo.

A expressão em nível basal é extremamente importante nos processos de indução, pois estas enzimas hidrolisam o substrato polimérico liberando moléculas menores, como pequenos celobiosídeos e monossacarídeos, que podem atuar como indutores no processo de produção de celulases e hemicelulases. Portanto, as enzimas secretadas em nível basal possuem um papel fundamental no processo de desencadeamento da indução de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Uma vez que moléculas indutoras entram nas células, estas podem induzir a ativação da transcrição de genes codificantes para celulases e hemicelulases culminando numa produção enzimática maciça. Estes processos são mediados por proteínas ativadoras e elementos ativadores.

A grande quantidade de enzimas secretadas hidrolisam os polímeros celulósicos e hemicelulósicos, fornecendo fonte de carbono necessária para a nutrição do fungo. Moléculas indutoras diversos fungos produzem celulases e hemicelulases somente quando estão em meio contendo a molécula alvo da hidrólise, como a celulose e a xilana. Todavia, a celulose, por ser um polímero de alta massa molecular, é incapaz de induzir por si só, o processo de indução de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Pensando nisto, muitas pesquisas têm focado os produtos da hidrólise da celulose, bem como da hemicelulose, a fim de investigar as reais moléculas envolvidas nos processos de indução. A xilose, um dos produtos da hidrólise da

xilana, pode atuar como molécula indutora em *Thermoascus aurantiacus* induzindo a produção de xilanase, β -glicosidase e endoglicanase.

Em contrapartida, este monossacarídeo, quando presente no meio em altas concentrações, atua de maneira reversa, e desencadeia o processo de repressão catabólica, inibindo a produção de celulases e hemicelulases. Enzimas xilanolíticas são produzidas em *Aspergillus* quando estes são crescidos em xilose e xilana. Todavia quando estes fungos crescem em glicose e galactose, a produção das enzimas não é ativada. Xilose e xilana são capazes de induzir não só a produção de enzimas xilanolíticas, mas também podem muitas vezes ativar a produção de enzimas celulolíticas. Isto sugere um sistema de regulação geral para estas enzimas em fungos do gênero *Aspergillus*.

Sobre ativadores transcricionais, uma proteína ativadora transcricional de *Aspergillus niger*, XlnR, tem sido isolada e classificada como membro da família de ativadores transcricionais do tipo GAL4. A caracterização de XlnR permitiu observar que esta proteína foi a responsável pela ativação dos genes de endoxilanase e β -xilidase. A expressão dos genes que codificam para XlnR é ativada em presença de xilose, portanto, é uma via de ativação pela xilose, um produto da hidrólise da xilana. Curiosamente, foi observado que XlnR estaria ligado não só a expressão de genes hemicelulolíticos, mas também à expressão de alguns genes celulolíticos. Alguns genes ativados por XlnR em *A. niger* são: duas endoxilanasas (xlnB e xlnC), uma β -xilidase (xlnD), duas endoglicanasas (eglA e eglB), dentre outros. Entretanto, genes codificantes para arabinofuranidase e β -glicosidase não foram regulados por XlnR.

A repressão catabólica por carbono altos níveis de glicose (e até mesmo outros monossacarídeos, como a xilose) no meio, ativam o chamado sistema de repressão catabólica por carbono em diversos fungos. Este sistema de repressão a nível transcricional, impede que haja maciça produção de (hemi)celulases de maneira desnecessária para o organismo. Um conhecido sistema de repressão catabólica por carbono é encontrado em fungos do gênero *Aspergillus*. Nestes, a proteína repressora catabólica (CreA), uma proteína com domínio dedo de zinco, se liga ao seus sítios específicos (SYGGRG), presentes em diversas regiões promotoras de uma ampla gama de genes, inibindo assim a transcrição destes. Outras proteínas repressoras catabólicas são a MIG1 em leveduras e a CRE1 em *H. Jecorina*. Todas estas proteínas apresentam regiões conservadas de ligação ao DNA (Suto e Tomito, 2001).

A produção de proteínas repressoras catabólicas ocorre de maneira constitutiva, e sua presença, parece ser fundamental para o desenvolvimento dos fungos, já que mutantes defectivos para estas proteínas são inviáveis. Sendo estas proteínas constitutivas, a maneira pela qual elas atuam na regulação da expressão gênica parece ser quanto a sua localização subcelular. A influência de proteínas repressoras catabólicas na regulação de enzimas envolvidadas na degradação da parede celular de plantas tem sido observada para diversas enzimas dentre vários gêneros de fungos. Em fungos do gênero *Aspergillus*, *CreA* tem atuado na repressão de enzimas como arabinases e enzimas do catabolismo de L-arabinose, várias xilanases, β -xilosidases, dentre outras (de Vries e Visser, 2001).

Farelo de trigo possui em sua composição altos níveis de proteínas (13–19%) e hemicelulose (3–6%), aliados a um baixo teor de lignina (3–6%). Essas características fazem do farelo de trigo um bom indutor de celulases e hemicelulases (Falkoski *et al.*, 2013). Em *C. cubensis* farelo de trigo induziu a produção dos maiores níveis de atividades de endoglicanase e xilanase, além apresentar bons níveis de atividade de β -glicosidase quando comparado às demais fontes de carbono avaliadas neste estudo. Extratos produzidos por *C. cubensis* cultivados em farelo de trigo apresentaram atividades de endoglucanase, xilanase e β -glicosidase iguais a 3,6; 14,2 e 0,36 U/mL, respectivamente. Este substrato induziu também, em menores quantidades, outras hemicelulases e apenas a atividade de α -galactosidase não foi detectada.

Para Aquino (2012), a farinha de trigo indicada para uso em panificação é a do tipo forte ou especial, por ser rica em proteínas de ótima qualidade e formadora de glúten, o que resultará em uma massa de boa consistência. A água é absorvida por proteínas, grânulos de amido e pentosanas da farinha. A quantidade de água que é absorvida depende da qualidade da farinha de trigo. A água que não é absorvida permanece como água livre. A potencial aplicação de xilanases na panificação é principalmente por melhorar a qualidade do pão.

A enzima pode ser efetivamente substituída pelos aditivos usuais como os emulsificantes e oxidantes. No entanto, para melhores resultados as enzimas devem ser usadas em seus níveis ótimos e uma alta dosagem pode levar a efeitos adversos no produto final. Durante o processo de panificação, as xilanases, e outras hemicelulases, clivam a hemicelulose da farinha de trigo, ajudando na redistribuição da água e tornando a massa mais

macia. Além disso, as xilanases atrasam a formação do miolo, permitindo o crescimento da massa. O resultado do processo são pães com maiores volumes, melhor absorção da água e melhoramento da resistência para fermentação. Durante o processo de mistura (energia mecânica), o glúten é formado.

A adição de xilanases nessa etapa pode afetar a formação do glúten, pois a enzima age, principalmente, na etapa de rearranjo das proteínas do glúten levando a quebra da sua estrutura, afetando o rendimento de glúten e suas propriedades reológicas. O aumento do volume do pão pelas xilanases pode ser explicado pela hidrólise das frações de hemicelulose insolúveis, principalmente arabinoxilana, liberando pequenos oligossacarídeos que absorverão muito menos água. Inicialmente, a ação das xilanases leva a formação de fragmentos solúveis em água, o que reflete no aumento da viscosidade, em seguida a viscosidade diminui por causa dos oligômeros menores, xilobiase e xilose, que são liberados pela hidrólise posteriormente. A maciez do pão é um efeito indireto da quebra de arabinoxilanas devido à liberação de água.

2.1.8 - Microrganismos produtores de xilanases

Oda *et al.* (2006) ao analisar proteínas excretadas por *A. oryzae* RIB40 em FES e FS, também em farelo de trigo, relata o crescente interesse pelas enzimas produzidas por este microrganismo por ser considerado seguro pela FAO, exceder a quantidade de enzimas excretadas em cultivo submerso, podendo ser considerado um modelo de fermentação para muitos fungos filamentosos e ser viável comercialmente por produzir em até 500 vezes mais que outros cultivos. Descreve que a excreção destas enzimas não pode ser controlada por fatores ambientais, pois são reconhecidamente no cultivo em estado sólido induzidas por fatores de nutrição no cultivo. Comenta que pouco se conhece sobre as enzimas excretadas mas que o ambiente de cultivo afeta esta atividade celular de forma impactante.

Muitas das xilanases produzidas comercialmente são obtidas por fungos com atividade ótima de pH ácidos a neutros e a temperaturas abaixo de 45 °C, como cita Franco (1999), pesquisando a extração de duas fases aquosas de xilanase alcalina produzida por *Bacillus pumilus*. Caballero (2006) estudou a produção xilanases pelo fungo *Aspergillus* SP 2M1,

analisando algumas propriedades desta enzima visando posterior aplicação em etapas de branqueamento de polpas de *Kraft* de eucalipto. Sanches e Cardona (2009) identificaram a alta atividade específica de hemicelulases tendo o fungo *Trichoderma longibrachiatum* como produtor da Endo-1,4- β -xilanase no substrato 1,4- β -xilana. Atividade de 6630 ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$), temperatura ótima de 45 °C e pH ótimo igual a 5.

A Tabela 2.3 apresenta a produção de xilanases em diferentes resíduos agroindustriais descritos na literatura.

Tabela 2.3 – Substratos e fungos utilizados para produção de xilanases.

Enzima	Substrato	Fungo	grupo	tipo
Xilanase	Sementes de uva, farelo de cevada, milho carozo, madeira de corte e suas aparas, palha de trigo e bagaço de cana	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Basidiomycota</i>	Podridão branca
	Palha de bagaço de cana	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Basidiomycota</i>	Podridão branca
	Bagaço de cana	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Ascomycota</i>	Podridão marrom
	Folhas de clavel, folhas de plantas jovens (do gênero Aster), lamela de aveia	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Ascomycota</i>	Podridão branca
	Folhas de clavel, folhas de plantas jovens (do gênero Aster), lamela de aveia	<i>Fusarium merismoides</i>	<i>Ascomycota</i>	Podridão marrom
	Folhas de clavel, folhas de plantas jovens (do gênero Aster), lamela de aveia	<i>Streptomyces</i>	<i>Actinomycete</i> (bacteriana)	Podridão branca
	Folhas de clavel, folhas de plantas jovens (do gênero Aster), lamela de aveia	<i>Penicillium SP.</i>	<i>Ascomycota</i>	Podridão branca
	Madeira fibrosa	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Basidiomycota</i>	Podridão branca
	Madeira fibrosa	<i>Xylaria hypoxylan</i>	<i>Ascomycota</i>	Podridão branca

Fonte: (Sanches e Cardona, 2009).

Maciel (2006) pesquisando o desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanase por FES utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja como substrato testou as 20 cepas selecionadas. A estratégia foi o cultivo em placas contendo somente xilana como única fonte de carbono. Adicionadas do corante vermelho congo que ao revelar os maiores halos indicava os maiores produtores de xilanases.

Gomes *et al.* (2007) em seu artigo sobre enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial discorrem que as xilanases hidrolisam as moléculas de xilanas por mecanismos de ação endo e exo. Essas enzimas têm sido muito utilizadas na indústria papelreira, na etapa de branqueamento da polpa *kraft*. O biobranqueamento da polpa por xilanases, em substituição ao cloro, promove a remoção da xilana ligada ao complexo lignina-carboidrato facilitando a lixiviação da lignina. Por outro lado, o tratamento do material com xilanase na fase de pré-cozimento ajuda a desorganizar a estrutura da parede celular facilitando, também, as etapas iniciais do processo. Desde que a madeira usada para produção de polpa é tratada a altas temperaturas (acima de 70 °C) e em pH alcalino, a etapa enzimática requer enzimas termoestáveis, com alta estabilidade e atividade em pH alcalino. Além disso, é necessário que o preparado enzimático seja livre de celulases, para evitar o ataque às fibras de celulose, assim se deseja xilanases muito ativas, para reduzir o custo, e com baixa massa molecular, para facilitar sua difusão na polpa.

As xilanases comerciais como as Pulpzyme e Cartazyme não são termoestáveis o suficiente (atividade ótima 50–60 °C e mantêm 50% de sua atividade por 15 min a 55 °C) para evitar a necessidade de um resfriamento da polpa após o tratamento alcalino. Inúmeros trabalhos têm relatado a produção de xilanases alcalinas e termoestáveis por organismos termófilos e hipertermófilos, de procariotos e eucariotos. As atividades das xilanases termoestáveis descritas têm variado de 60 a 100 °C. Bactérias termofílicas, como *Bacillus* sp, *Bacillus*, *Amyloliqefaciens*, *Bacillus circulans*, *Streptomyces* sp, *Thermoactonomyces thalophilus* sub grupo C e *Thermotoga* sp, têm se mostrado boas produtoras de xilanases termoestáveis, as quais atuam a 80 °C. Entre os fungos, destacam-se o *Thermoascus aurantiacus*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Paecilomyces variotim*, *Paecilomyces thermophila*, *Scytalidium thermophilum*, *Melanocarpus albomyces* e *Chaetomium thermiphile* com xilanases atuando entre 50 e 80 °C. *Thermomyces lanuginosus* é conhecido por produzir altas concentrações de xilanase livre de celulase em fermentação submersa em meio com resíduos agrícolas como

fontes de carbono. Duas endoxilanasas termoestáveis ativas e estáveis a pH alcalino produzidas por fungo termófilo *Myceliophthora* sp. IMI 387099 foram descritas recentemente Gomes *et al.* (2007).

Além do tratamento de polpa *Kraft*, as endoxilanasas produzidas por *Thermomyces lanuginosus* e *Thermoascus auranticus* têm sido utilizadas no processamento de alimentos e nas indústrias de processamento do amido. E ainda endo- β -xilanasas com temperaturas ótimas de atividade em torno de 90 °C foram isoladas a partir de cultivo de hipertermofílicos *Thermotoga* sp, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga. neapolitana*, *Thermotoga themarum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* e *Sulfolobus solfataricus*, como relatado por Gomes *et al.* (2007).

Lemos (2006), comenta sobre a inclusão de aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos em função de sua habilidade em sintetisar enzimas com atividade xilanásica. A maioria dos estudos tem sido conduzida com aeróbios, fungos mesófilos e bactérias. Os actinomicetos apresentam amplas habilidades degradativas, razão pela qual despertaram a atenção de pesquisadores que têm se dedicado ao estudo da produção de enzima por esses microrganismos.

Enzimas como a xilanase e β -xilosidase que degradam a cadeia principal de xilana, a β -L-arabinofuranosidase e acetil xilana estearase e que hidrolisam a cadeia lateral, já foram detectadas em vários actinomicetos, entre os quais o gênero *Streptomyces* que tem sido amplamente estudados. A respeito da atividade bacteriana sobre hemicelulose, o gênero *Bacillus* parece o mais eficiente para produção de xilanasas. Este gênero é o mais utilizado em fermentações industriais, pela habilidade de excretar as enzimas sintetisadas. Bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Corynebacterium* e *Bacillus* já foram estudadas comparativamente em função da capacidade de degradação de xilanas, obtendo os melhores resultados com os dois últimos gêneros (Lemos, 2006)

Andrade *et al.* (2012) selecionaram entre 394 isolados de leveduras silvestre a linhagem de *Cryptococcus flavescens* LEB-AY10 como produtora de xilanase termoestável extracelular com atividade ótima a 80 °C. Em sua recuperação utilizaram resina de troca iônica DEAE

Streamline (25 mL), com recuperação de 45% da atividade inicial e massa molecular estimada de 48 kDa.

Padilha *et al.* (2009), com isolado de *Pseudomonas cepacia* em leito de adsorção expandido e resina de troca iônica Amberlite IRA 410, para purificar xilanase obteve fator de purificação de 80 vezes, em 6 cm de expansão do leito, parâmetros ótimos pH 8 e temperatura de 37 °C com energia de ativação de 10,2 KJ/mol.

Apresenta-se um resumo de microrganismos produtores de xilanase, fonte de carbono utilizada como substrato e a classificação da xilanase descoberta na Tabela 2.4 abaixo.

Tabela 2.4. - Microrganismos produtores de enzimas xilanolítica.

Microrganismo/condição/ fonte de carbono	Endo-xilanase (U/L)	β-xilosidase (U/L)	Referência
<i>Streptomyces flavogriseus</i> / FS / farelo de trigo	1590	–	Johnson <i>et al.</i> (1988)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> / FS / farelo de trigo	10280	–	
<i>Streptomyces C-254</i> / FS / farelo de trigo	6440	–	
<i>Aspergillus ochraceus</i> / FS / palha de trigo	12800	3200	Biswas <i>et al.</i> (1988)
<i>Aspergillus ochraceus</i> / FMS / farelo de trigo	28100	8100	
<i>Cephalosporium</i> / FS / farelo de trigo	36200	–	Bansod <i>et al.</i> (1993)
<i>Aspergillus sidowii</i> / FS / palha de trigo	1465	1720	Gosh <i>et al.</i> (1993)
<i>Aspergillus sidowii</i> / FS/ farelo de trigo	1100	1140	
<i>Aspergillus fischeri</i> FXN1/ FS / farelo de trigo	41800	–	Raj &Chandra (1995)
<i>Aspergillus tamarii</i> / FS / farelo de trigo	54320	510	Kadowaki <i>et al.</i> (1997)
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8/ FMS / farelo de trigo	40260	–	Couri <i>et al.</i> (2000)

Fonte: Lemos (2006). FS = fermentação submersa e FMS = fermentação meio sólido.

Fernandez (2009) mencionava que as enzimas de origem bacteriana têm tendências a ter os ótimos de atividades a valores de pH neutros ou básicos, enquanto as enzimas obtidas a partir de fungos filamentosos e leveduras apresentam valores ótimos de atividade em pH ligeiramente ácidos. Alguns autores relatam a produção de xilanase por bactérias e fungos (Xiong *et al.*,2004).

O gênero *Aspergillus* é de grande interesse e importância na área de biotecnologia para a produção de enzimas, estes sintetizam altos níveis de proteínas; possuem boas propriedades para a fermentação que permitem a produção em grande escala. Os produtos destes fungos são reconhecidos como *Generally Regarded as Safe* (GRAS) o que permite seu emprego em alimentos e dietas alimentares. Também produzem enzimas de interesse na degradação dos polissacarídeos da parede celular e algumas espécies são capazes de produzir aflatoxinas. Além disso, fungos do gênero *Aspergillus* têm sido empregados amplamente na indústria para produção de enzimas extracelulares, ácido cítrico e tratamento de resíduos. Reporta-se também a capacidade de determinadas cepas de sintetizar mais de uma enzima em um mesmo processo (Wang *et al.*, 2006). É por isso que essas espécies são altamente atrativas para uma eventual produção de várias enzimas, ao mesmo tempo, e seu emprego nas rações alimentares ou outros ramos industriais.

Sales *et al.* (2010) analisando variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus* relataram que as variáveis que influenciam a produção simultânea das celulasas e xilanasas são pH, tempo de cultivo, tipo de resíduo e espécie do *Aspergillus*. Obtendo as melhores condições de produção de xilanase com pH 6,0, tempo de cultivo de 168 horas, resíduo de bagaço de cana de açúcar como substrato e *Aspergillus aculeatus* URM 4953, atingindo 30,05 U ml⁻¹.

Lopes (2010) com o objetivo de otimizar a produção de xilanase produzida por cepa de levedura silvestre isolada da mata atlântica, mostrou que existe um efeito negativo na adição do tampão fosfato ao meio de cultivo comprometendo a atividade final. De acordo com o modelo estatístico aplicado, a máxima atividade enzimática encontrada foi de 67,45 UI para o ponto central do planejamento experimental, onde a concentração de xilana foi de 20 gL⁻¹ e a temperatura de 30 °C.

Lameira (2013) avaliou a produção de xilanases em resíduos agroindustriais por fermentação submersa com microrganismo *Bacillus sp* 3M obtendo atividade xilanolítica de 1,35 U/mL utilizando farelo de trigo como substrato. Caracterizada com massa molar de 420 kDa e mantendo-se estáveis a 60°C por 3 horas, em pH ótimo entre 7 e 7,5.

Os fungos termofílicos são microrganismos capazes de crescer em temperaturas entre 20 e 50 °C. De acordo com Rosa (2014), entre os representantes de eucariotos poucas espécies descritas crescem entre 45 e 55 °C, sendo classificadas como termofílicas moderadas. Dentre as 50.000 espécies de fungos descritas, somente cerca de 30 apresentam crescimento em temperaturas entre 40 e 45 °C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60 e 62 °C, apresentando seu ótimo em torno de 50 °C. Os fungos filamentosos são representantes da microbiota com grande habilidade de se desenvolver em material vegetal, como resíduos agrícolas e silvícolas, grãos armazenados, e madeira exercendo na natureza o papel de principais cicladores de carbono.

Lopes *et al.* (2009) apresenta sugestão de método de seleção de microrganismos por índice enzimático método de coloração com Vermelho Congo. Comenta que a produção em escala industrial de xilanases é dominada por *Aspergillus* e *Trichoderma* e que a grande utilização de fungos e sua importância na produção e comercialização de enzimas está na facilidade de extração sem necessidade de ruptura celular. A estratégia é medida do halo de crescimento do fungo a cada 24 h. Não foi utilizado como referência neste trabalho por considerar-se mais objetivo os resultados de produção enzimática por determinação da AE.

Silva *et al.* (1998) estudando a extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho comenta que a parede celular dos vegetais é constituída basicamente por aglomerado polimérico de celulose, pectina, lignina e grupo de polissacarídeos denominado hemiceluloses, que caracterizam-se por insolubilidade em água e solubilidade em soluções alcalinas. Em produtos alimentícios sabe-se que as xilanas presentes nas farinhas de trigo apresentam grande importância no cozimento e maciez das massas devido a capacidade que possuem de reter água, reduzindo significativamente o envelhecimento, por interações com o amido. Apresenta um método de extração aquosa de 30 g de pó de sabugo de milho para 1000 mL de água destilada sob agitação constante por 12 h a temperatura ambiente como extração da xilana, centrifugada e fase sólida seca à pressão reduzida por 24 h.

No apelo de alimentação saudável encontrou-se o estudo de Zhang *et al.* (2012) que relata a identificação de substâncias antioxidantes naturais da fermentação de trigo (*Triticum aestivum* Linn) por *Cordyceps militaris* que podem ser utilizadas pela indústria de alimentação funcional.

2.2 - Processos fermentativos em estado sólido e suas características

Definida por Durant *et al.* (1988) como “ processo que refere-se ao crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partícula matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ele está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida. A forma de processo denominada FES “fermentação em estado sólido” é comumente empregado no continente africano para a obtenção de alimentos.” Podendo ser citada sua utilização há milênios, como por exemplo: produção de molho de soja em 1.000 a.C e a de “chiang” entre 2.500 e 500 a. C., sendo obtidos por modificação enzimática do meio utilizando “ Koji” (massas de cereal cozido geralmente de arroz onde houve o crescimento de *Aspergillus oryzae* e produção do complexo enzimático). No ocidente o primeiro processo de fermentação em estado sólido relatado foi a obtenção de queijo roquefort em 10 d.C. e associado no início do século ao pesquisador Takamine nos Estados Unidos a produção de “mold bran” similar ao “Koji”, utilizando farelo de trigo como substrato e fungos para obtenção de complexo enzimático que visava substituir o malte na indústria de destilados (Schimidel *et al.*, 2001).

Atualmente o Japão domina a tecnologia de fermentação em estado sólido por ter dado continuidade ao estudo do processo tradicional realizado utilizando bandejas de madeira ou bambu, onde os cereais como arroz ou trigo e soja eram inoculados e fermentados com o “Koji”. Hoje aperfeiçoado projetando-se incubadoras automatizadas, controle de condições ambientais, agitação controlada do meio, novas técnicas de recuperação do produto final e utilização de linhagens mutantes melhoradas (Underkofler *et al.*, 1947).

Apesar de diversas pesquisas estarem sendo conduzidas com substrato sólido, tanto na obtenção dos bioprodutos, como no estudo dos equipamentos e condições de processo, em níveis industriais o processo submerso continua sendo o principal gerador de produtos comercializados. Com o apelo da sustentabilidade e economia do recurso natural água ergue-se novamente a pesquisa para aproveitamento dos resíduos por fermentação em estado sólido.

Seguem algumas vantagens da FES comparada a fermentação submersa (Underkofler *et al.*, 1947):

- Baixa umidade que proporciona menor risco de contaminação;
- Simplicidade no preparo do meio de fermentação;
- Possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido;
- Menor necessidade de espaço;
- O crescimento celular ocorre em condições mais próximas aos do *habitat natural*;
- Baixo consumo de água.

Desvantagens também são apresentadas, como: dificuldade de remoção do calor gerado no processo, a heterogeneidade da mistura do substrato que dificulta o controle do crescimento celular, e dificuldades quanto ao controle a automatização do processo nos parâmetros de temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos (Palma, 2003).

Segundo Fernandez (2009) as vantagens da fermentação em estado sólido comparada com a fermentação submersa são os seguintes aspectos (Doelle *et al.*, 1992):

- Os meios de cultivo são simples, geralmente subprodutos agrícolas que apresentam um alto teor dos nutrientes necessários;
- A baixa atividade da água impede as contaminações, especialmente bactérias e leveduras;
- A concentração natural do substrato permite utilizar reatores menores quando comparadas com as fermentações submersas;

- A aeração forçada é facilitada pela porosidade do suporte, o que permite uma alta transferência de ar e, por conseguinte de oxigênio;
- Podem se empregar freqüentemente esporos como inóculo nos processos de crescimentos de fungos, o que diminui os custos e as manipulações da propagação do inóculo;
- Os esporos dos fungos que são produzidos são mais resistentes e tem melhor adaptabilidade nas condições de aplicação agrícola;
- Os processos de recuperação são simplificados, sendo alguns utilizados integralmente para ração animal e consideradas tecnologias limpas.

Entre as principais desvantagens encontram-se segundo (Doelle *et al.*, 1992):

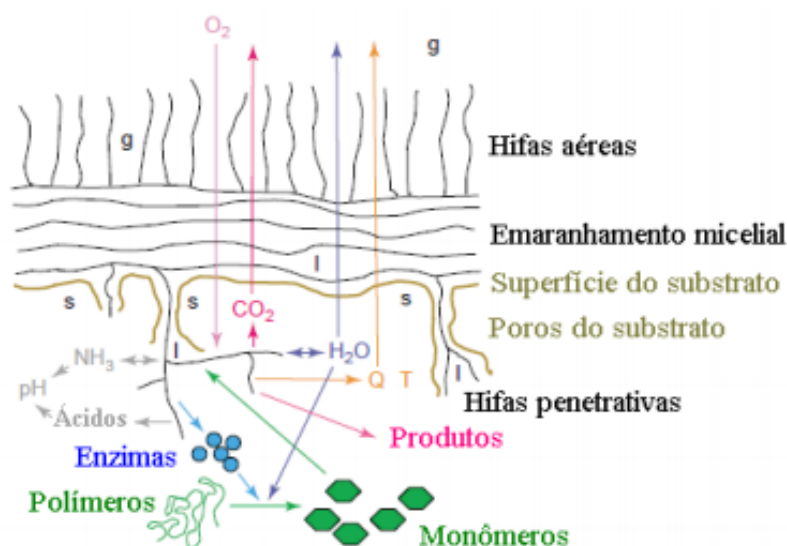
- As aplicações geralmente estão limitadas a microrganismos que crescem a baixos teores de umidade;
- A dissipação do calor gerado pode ser um problema, principalmente quando se trabalha em grande escala e não se controla o processo;
- A natureza sólida do substrato dificulta a medição de parâmetros da fermentação, tais como pH, temperatura, umidade e concentrações de substratos e produtos;
- Os processos de transferência de massa são limitados pela difusão;
- Muitos aspectos de engenharia, como o desenho e escalonamento de processos são pouco caracterizados;
- O tempo de fermentação é maior, pois geralmente são utilizados microrganismos que apresentam baixas velocidades específicas de crescimento.

Os fungos são potenciais candidatos para produzir enzimas mediante processos de fermentação em estado sólido. Uma importante variedade de produtos enzimáticos comerciais, compostos de fitases, pectinases, xilanases, proteases, alfa e glicoamilases, são produzidos a partir de fungos. Nos últimos anos os estudos das fermentações em estado sólido estão focados no desenvolvimento de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento e monitoramento destes processos fermentativos (Pandey, 2000). Também devem ser conhecidos os efeitos dos solventes utilizados sobre os metabólitos de interesse, pois têm sido reportadas perdas de até 90% devido aos solventes empregados na extração. No caso específico das pectinases, xilanases e fitases, é necessário saber que essas enzimas são praticamente insolúveis em álcoois e outros solventes orgânicos.

2.2.1 - Fatores de influência no processo de fermentação em estado sólido (FES)

Pandey *et al.* (2000) relatam que todos os processos de FES precisam contemplar as seguintes etapas: seleção matéria-prima/substrato, determinação do microrganismo específico, em alguns casos operações unitárias de separação, a purificação dos produtos e controle dos parâmetros de produto.

O controle das condições ambientais na FES evidencia a influência dos parâmetros: temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos (Santos *et al.*, 2010). A Figura 2.10 representa a imagem das reações químicas em decorrência do crescimento do fungo para evidenciar os múltiplos fatores à serem considerados no processo de fermentação em estado sólido.



Fonte: HOLKER e LENZ, (2005).

Figura 2.10 Múltiplas reações que ocorrem na FES

Representa-se conforme Rosa (2014), por cores variadas os microprocessos que ocorrem durante a FES ocasionada por fungos. As hifas, após esporular, formam hifas aéreas ou então penetram no substrato. Os espaços que surgem entre elas são preenchidos por gás, quando aéreas ou por líquido, quando as mesmas estão inseridas no substrato. O metabolismo se concentra próximo à superfície e entre os poros, mas também ocorre na parte aérea (hifas aéreas). As enzimas hidrolíticas representadas na figura pela cor azul são produzidas pelo micélio, após difundirem-se para a matriz sólida, catalisam a degradação de macromoléculas (verde). Gás carbônico, água, calor e outros produtos são produzidos quando do consumo de oxigênio. Com isso, diferentes concentrações de gradiente são formadas, o que por sua vez forçará o O₂ a se difundir para a fase gasosa em regiões mais profundas (lilás). Um problema observado durante a FES é a liberação de calor metabólico que eleva a temperatura (T); a solução se dá por meio de condução e evaporação (azul escuro).

O sistema de equilíbrio de H₂O inclui a que passa lentamente pelo micélio, a consumida durante as reações de hidrólise e a que é produzida durante a respiração. Outro importante fator é o pH, que pode ser mudado devido a liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia (cinza). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada adsorvida na superfície das partículas. Em geral, nesses processos, o teor de umidade varia entre 30 a 85 % e deve ser mantido ao longo do processo de FES. Uma condição ótima deve ser estabelecida, pois baixos níveis de umidade reduzem a difusão de nutrientes, crescimento microbiano, estabilidade enzimática e a adsorção do substrato, o que prejudicaria o processo. Tipicamente a atividade de água livre varia de 0,40 a 0,90, o que reproduz as condições encontradas na natureza e permite que os procedimentos sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação, pelo menos por bactérias, é pouco provável com valores tão baixos. Indicando assim que a pesquisa de lipases deve ser conduzida em FS.

Existem também, características da matriz sólida que possibilitam maior rendimento do processo, dentre elas: grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio, porosidade, tamanho e formato das partículas.

Quanto ao tamanho da partícula, este visa a facilitar a circulação do ar por entre a massa e dissipar os gases e calor produzidos. Sendo assim necessário, para não prejudicar o rendimento do processo, a definição da altura do substrato e a granulometria do meio.

Quanto a porosidade, esta facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os microrganismos devido a sua capacidade de absorção de água. Neste aspecto, o teor de umidade do substrato tende a variar entre 12 e 80%, pois abaixo deste limite mínimo não ocorre desenvolvimento microbiano. E o limite superior é fixado em função da capacidade de absorção de água pelo material empregado (Andrade *et al.*, 1999).

Alguns processos podem ser empregados para aumentar a atuação microbiana: esmagamento, moagem, hidrólise, suplementação com nutrientes, regulação do teor de umidade, vaporização ou aquecimento, adição de agente sequestrante e esterilização, que visa diminuir as possíveis contaminações. Alguns autores inclusive defendem a teoria de que por somente aumentar a quantidade do inóculo evita-se o problema da contaminação sem necessitar da esterilização do meio, como por exemplos durante a obtenção de penicilina e etanol (Barrios-González *et al.*, 1996).

Segundo Palma (2003) a aplicação comercial dos processos de FES podem ser divididos em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais; 2) Aplicações economicamente viáveis para produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados.

He *et al.* (1994) e Isil e Nifuler (2005) evidenciaram a necessidade de estudo dos fatores interferentes no processo de fermentação e sua sinergia em prol de melhor eficácia de transferência de tecnologia entre universidades e indústrias.

Jaekel (2012) amplia esta visão já realizando em seu trabalho testes de utilização das enzimas produzidas na área de panificação visando evidenciar sua eficiência na alteração de parâmetros industriais de produção de pães, ou seja, estudo de aplicação.

Rosa (2014) relatou o isolamento de cepas fúngicas termofílicas, assim como, a obtenção de preparados enzimáticos com estabilidade às variações de temperatura e pH que ocorrem durante as etapas da hidrólise. Foram isoladas 32 linhagens de fungos capazes de crescer em temperaturas entre 45 e 60 °C, tendo sido selecionadas cinco para as etapas seguintes do trabalho (*Thermomyces lanuginosus* S1, *T. lanuginosus* S3, *Rasamsonia emersonii* S10, *T. lanuginosus* FZI e *R. emersonii* BC) em função de apresentarem crescimento a 60 °C. Entre essas linhagens, as maiores atividades de β -glicosidase (52 U/g) e

endoglucanase (579 U/g) foram obtidas em meio de cultivo da cepa *R. emersonii* S10 em 240 h para ambas as enzimas. A melhor atividade de FPase foi apresentada pelo fungo *T. lanuginosus* S1 em 168h de cultivo, tendo produzido 262,8 U/g da enzima. O fungo *R. emersonii* S10 foi o único que apresentou a produção detectável das enzimas avicelase (9,2 U/g) e β -xilosidase (910,7 U/g). Esse isolado também produziu as maiores atividades de xilanase com 8.684,8 U/g. A atividade da celobiose desidrogenase foi detectada em todas as linhagens, sendo o isolado *R. emersonii* BC o que apresentou a maior produção, com 7,2 U/mL em 288 h.

Capítulo 3

Material e métodos

3. - Material e métodos

Este capítulo descreve o material e metodologias utilizados na condução deste trabalho que foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal/RN.

Trabalhou-se com resíduo da fabricação de margarina e da fabricação de farinha de trigo, o farelo de trigo. Com relação ao resíduo da fábrica de margarina, a coleta de amostras para caracterização dos substratos foi realizada na unidade Gorduras e Margarinas Especiais – GME, localizada em Fortaleza-CE. Foram coletados 500 g de amostra de cada resíduo da fabricação de margarinas: resíduo da refinaria e resíduo da estação de tratamento de efluentes -ETE.

No Grande Moinho Potiguar – GMP, instalado em Natal-RN foram coletados 5 kg de amostra de farelo de trigo Argentino *Triticum aestivum* safra 2012, granulometrias de 600 e 1200 µm, já comercializados como subproduto da fabricação de farinha de trigo.

3.1 - Caracterização físico-química dos resíduos da fabricação de margarinas

A caracterização foi realizada por laboratório terceirizado IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas em São Paulo. As análises realizadas foram: análise do material por hidrólise segundo metodologia de hidrólise de resinas alquídicas (MCQ-LAQ-PE-QO-055); análise qualitativa de compostos orgânicos por cromatografia em fase gasosa; análises dos ácidos carboxílicos por análise quantitativa de compostos orgânicos por cromatografia em fase gasosa (CMQ-LAQ-PE-QO-005); Os equipamentos utilizados foram: balança analítica marca Metler modelo AB204-S; estufa marca Químis 317 (ESQU-4); espectrômetro no infravermelho marca Nicolet modelo Avatar 360; e espectrômetro de massas marca Shimadzu modelo GCMS QP 5050A; cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC17A.

3.1.1 - Classificação dos resíduos da produção de margarina

Para a classificação de resíduos foram realizados ensaios analíticos que apresentam os parâmetros considerando especificações da ABNT NBR 10.004:2004 – Resíduos sólidos e NBR 10.005 – ensaios de lixiviação e NBR 10.006 – ensaios de solubilização, para classificação de resíduos. A caracterização das amostras foi realizada por laboratório terceirizado, IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas em São Paulo.

3.2 – Caracterização do Farelo de trigo

As metodologias utilizadas para caracterização do farelo de trigo demandam etapas de preparação da amostra para uniformização de granulometria. O resíduo foi lavado com água destilada, secado em estufa, moído em triturador e peneirado em peneiras de 250 *mesh*. Após esta etapa porções do material foram submetidas à extração Soxhler, utilizando etanol como solvente, para passar por processo de hidrólise com ácido necessária à análise dos carboidratos. Foi realizada a caracterização dos resíduos quanto a sua composição em termos de granulometria, umidade, proteínas, cinzas, pH e densidade aparente bem como sua caracterização quanto à composição de celulose, hemicelulose e lignina.

3.2.1 Granulometria

Na determinação da granulometria utilizou-se conjunto de quatro peneiras de 250 μm , 280 μm , 630 μm e 1120 μm . Amostras de 100 gramas de cada resíduo foram pesadas em balança analítica e adicionadas ao agitador de peneiras marca Contengo-pavistest durante 10 minutos. O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados foram expressos em percentuais em relação ao peso do material original (Puchart *et al.*, 1999).

3.2.2 - Umidade (perda por dessecação)

A determinação da umidade foi realizada de acordo com o método 413/IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Após pesagem de 2 g da amostra, em cápsula de porcelana previamente tarado o conjunto e aquecida em estufa (Quimis/Q-317B232) a 130°C por uma hora. Em seguida foi resfriada em dessecador com sílica gel, até temperatura

ambiente. O aquecimento e resfriamento repetidos até peso constante determina a umidade da amostra, com resultados expressos pela Equação (1):

$$U\% = \frac{[100 \times n^{\circ} \text{ de gramas de umidade (perda de massa em gramas)]}{n^{\circ} \text{ de gramas da amostra}} \quad (1)$$

3.2.3 - Proteína total

Determinação de nitrogênio por processo de digestão Kjeldahl modificado método nº 037/IV, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Para o cálculo do percentual de proteína seca, o fator empírico de: 5,83 (amostra) foi introduzido para transformar o número de gramas de nitrogênio encontrado em percentual de proteína, conforme mostra a Equação (2):

$$\% \text{ proteína} = \frac{\text{quantidade em mL de ácido sulfúrico } 0,05M \times 0,14 \times 5,83}{(\text{massa da amostra em g})} \quad (2)$$

3.2.4 - Cinzas (resíduo por incineração)

Na determinação do teor de resíduo mineral nos resíduos de farelo de trigo pesou-se 5 gramas da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla (Quimis, Q – 318D24) a 550 °C, resfriada em dessecador até temperatura ambiente. Na mufla realizou-se carbonização prévia a 300 °C seguida a 550 °C, quando ocorre a eliminação completa do carvão. Repetiu-se a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante. A determinação do percentual de cinzas foi baseada no método 018 /IV do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), e expressa em g/ 100 gramas de produto, de acordo com a Equação (3):

$$\text{Cinzas \%} = \frac{(100 \times n^{\circ} \text{ de gramas de cinzas})}{n^{\circ} \text{ de gramas da amostra}} \quad (3)$$

3.2.5 – Determinação pH

Seguindo a metodologia (IAL, 2005) preparou-se uma suspensão de 10 mL de água destilada e 1,0 g da amostra sólida. Após homogeneização e repouso de 30 minutos o pH foi mensurado em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões

3.2.6 - Densidade aparente

Para determinar o volume ocupado pela amostra, (Purchat *et al.*, 1999) foi realizada a pesagem de 100 gramas dos resíduos em provetas de 1000 mL, sem haver compactação. A densidade aparente foi expressa conforme Equação (4):

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume ocupado (mL)}} \quad (4)$$

3.2.7 - Caracterização dos resíduos lignocelulósicos

A metodologia foi estabelecida segundo *Determination of total solids in biomass NREL/TP- 510-42618-National renewable energy laboratory, Sluiter et al.* (2005). Para a sua caracterização, o farelo de trigo passou inicialmente por algumas etapas que visam remover impurezas e estabelecer um padrão de granulometria. Essas etapas são: lavagem água destilada (3 vezes), secagem (60 °C por 24 h), moagem (análise da composição e análise determinação cinzas) e peneiração.

3.2.7.1 - Determinação da umidade

Em um béquer de 25 mL tarado foram colocados cerca de 1g de farelo de trigo. O béquer foi fechado com papel alumínio, pesado e levado para uma estufa a 105 °C por cinco horas. Após esse período, o material foi colocado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, para efetuar novamente a pesagem.

A umidade foi determinada, para triplicatas, conforme a Equação (5) abaixo:

$$\%U = \left(1 - \frac{M_{seca}}{M_{úmida}} \right) * 100 \quad (5)$$

Onde:

%U = percentual de umidade

M_{seca} = massa seca obtida pela diferença entre o peso do conjunto depois da estufa e o peso do béquer

$M_{úmida}$ = massa úmida obtida pela diferença entre o peso do conjunto antes de ser levado para a estufa e o peso do béquer.

3.2.7.2 - Determinação de extrativos

Para a determinação dos extrativos, foram pesados 5 g de material, os quais foram submetidos a um tratamento em aparelho de Soxhler, utilizando-se etanol como solvente extrator, por um período de 24 horas.

O material lignocelulósico foi colocado em um cartucho de papel de filtro, previamente seco e tarado. Ao final do processo extrativo, o cartucho com o material foi seco em estufa a 105 °C até peso constante. A percentagem de extrativos foi calculada com base na diferença de massa, conforme a Equação (6), abaixo.

$$\%Ext = \frac{M_i - M_f}{M_f} * 100 \quad (6)$$

Onde:

% Ext = percentual de extrativos

M_i = massa seca não extraída

M_f = massa seca extraída

3.2.7.3 - Hidrólise com H₂SO₄ (72%)

100 mL da amostra, transferida para um béquer de 100 mL, foi tratada com 13 mL de uma solução de ácido sulfúrico (72%) por um período de 15 minutos sob vigorosa agitação manual a 45 °C, em banho termostatizado.

A reação foi interrompida com 50 mL de água destilada, sendo a mistura reacional transferida para frascos Erlenmeyers de 500 mL, onde completou-se o volume de água adicionada para 275 mL. As amostras foram transferidas para Erlenmeyer fechado com papel alumínio. Para completar a hidrólise dos polissacarídeos foi autoclavado por 30 min a 1,05 atm. O material hidrolisado foi separado dos sólidos por filtração, utilizando-se papel de filtro previamente seco e tarado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido o papel de filtro lavado com porções de 50 mL de água destilada até atingir o volume do balão de 1000 mL.

3.2.7.4 - Determinação dos teores de celulose e de hemicelulose, por análise dos polissacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Esta determinação depende das concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos presentes no hidrolisado, por isso fatores de conversão foram usados para converter as massas destes compostos em massa de celulose e hemicelulose (Tabela 3.1). Estes fatores se baseiam na estequiometria de conversão dos referidos componentes em suas moléculas precursoras: celulose e hemicelulose.

Para análise dos carboidratos e ácidos orgânicos, as análises foram realizadas em CLAE utilizando coluna Shim-pack SCR-101H (300 x 7,8 mm), fase móvel solução de ácido sulfúrico 5 mM, a temperatura de 65 °C, com tempo de corrida de 60 min e detector do índice de Refração - IR.

Tabela 3.1 - Componentes precursores da celulose (C) e hemicelulose (H) e seus respectivos valores de conversão.

Componente	Fator de conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Ácido Fórmico (C)	3,09
HMF (C)	1,29
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido Acético (H)	0,72
Furfural (H)	1,37

Fonte: Pitarelo (2007).

As concentrações de cada componente foram obtidas através de curvas de calibração que correlacionam concentrações dos padrões preparados com as respectivas áreas dos cromatogramas, conforme Tabela 3.1.

3.2.7.5 - Lignina insolúvel

O material retido no papel de filtro, após a hidrólise ácida, que corresponde à lignina insolúvel e inorgânicos, foi submetido a uma lavagem para remoção de sulfatos com um volume de água destilada de 1500 mL, e seco em estufa a 105 °C até peso constante. Por diferença de massa foi determinado o teor de lignina insolúvel e inorgânicos (cinzas). Para obter o teor de lignina insolúvel real, foi necessário se determinar as cinzas do material retido no papel.

3.2.7.6 - Teor de cinzas da lignina insolúvel e cinzas totais

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C, seguindo-se mais 2 horas a 800 °C, em uma mufla.

Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinada conforme a Equação (7) abaixo:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{Mc}{Ma} * 100 \quad (7)$$

Onde:

% cinzas: percentual em massa de cinzas

Mc: massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio)

Ma: massa da amostra (base seca)

3.2.7.7 - Lignina solúvel

A concentração de lignina solúvel presente no hidrolisado foi determinada por espectrometria, utilizando-se a Equação (8) abaixo:

$$C_{\text{lig sol}} = 4,187 \times 10^{-2} \times (A_{\text{lig 280}} - A_{\text{pd280}}) - 3,279 \times 10^{-4} \text{ [g/L]} \quad (8)$$

Sendo:

$C_{\text{lig sol}}$: concentração de lignina solúvel, em g/L

$A_{\text{lig 280}}$: absorvância em 280 nm

$A_{\text{pd280}} = C_1 \cdot \epsilon_1 + C_2 \cdot \epsilon_2$ (C_1 e C_2 : concentração de furfural e hidroximetilfurfural; ϵ_1 e ϵ_2 : coeficientes de extinção para o furfural ($146,85 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e o hidroximetilfurfural ($114 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$))

Antes de realizar a leitura em espectrofotômetro, o hidrolisado reservado sofreu ajuste de pH para 12,5. Isso foi feito adicionando-se, em balão de 100 mL, 25 mL do hidrolisado, 7,5 mL de solução de NaOH (6M), o restante de água destilada e o pH foi aferido em phmetro calibrado.

3.3. – Produção de enzimas

Para escolha do microrganismo foi consultada a RDC nº 205, de 14 de Novembro de 2006, como roteiro de pesquisa de microrganismos a serem testados, pois a mesma, regulamenta tecnicamente sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. Dentre as consultas imprescindíveis, foi pesquisado o site da FAO que apresenta classificação de microrganismos produtores, descrições das enzimas, funcionalidades e suas atividades.

3.3.1 Microrganismos testados

Na avaliação do potencial dos resíduos para produção de enzimas optou-se pela estratégia de isolamento e seleção no próprio resíduo: 1. Cepa do farelo de trigo da mescla de trigo Argentino (*Triticum aestivum*) fabricado em 18/02/13 na unidade Grande Moinho Potiguar, Natal/RN. O meio de cultivo utilizado para preparo do pré-inóculo foi o meio de Xiong *et al.*(2004) adaptado e foram realizados testes do volume necessário de pré-inóculo de 2 e 10 mL, substituindo-se a lactose pelos resíduos investigados como substrato.

Investigou-se também o potencial de cepas da coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello (Campinas/São Paulo), espécies *Aspergillus oryzae* CCT nº 0975 (ATCC 9362), *Trichoderma reesei* CCT nº 2768 (QM 9414) denominada recentemente como *Trichoderma longibrachiatum*, consórcio do *Aspergillus oryzae* com *Trichoderma reesei* e bactéria da espécie *Bacillus subtilis* CCT nº 7457, na produção de enzimas.

O critério utilizado para seleção foi o crescimento exuberante e produção de proteína total nas 72 horas iniciais do processo de fermentação e a constatação de atividade enzimática xilanásica.

3.3.2 Condições de tratamento prévio do farelo de trigo avaliadas

Como investigação das melhores condições de utilização do farelo de trigo para FES foram testados: 1. Farelo de trigo lavado e auto-clavado (LA), 121°C por 15 min; 2. Farelo de trigo não lavado e auto-clavado (NLA); 3. Farelo de trigo não lavado e não auto-clavado

(NLNA); farelo de trigo não lavado, e farelo de trigo não auto-clavado tratado com dióxido de cloro. A adição de dióxido de cloro já é utilizada como rotina na desinfecção do trigo sendo realizado por bombeamento na passagem da água que realiza a lavagem dos grãos.

Para avaliação da granulometria do resíduo utilizado realizaram-se os seguintes testes com granulometrias já disponibilizadas na indústria: farelo de 600 μm , de 1200 μm e uma mistura de 50% de cada perfazendo farelo de granulometria média de 900 μm .

Para avaliação de necessidade de aditivação foram utilizados: resíduo sem nenhuma adição e resíduo adicionado de 1% de sulfato de amônio (Santos, 2007).

3.3.3 Manutenção dos microrganismos

Para visualizar as etapas de utilização dos microrganismos na FES no anexo 1 apresenta-se o conjunto das atividades. Os microrganismos foram ativados em duas etapas de transferência em câmara de fluxo laminar, conforme procedimento adotado por Couri (1993) e mantidos segundo as recomendações da coleção de cultura tropical da Fundação André Tosello.

3.3.3.1 Bactéria

Utilizou-se Agar nutriente (NA- fabricante Acumedia Manufactures) que contém extrato de carne e peptona concentração (8 g/L), com adição de Agar (15 g/L) para bactéria da espécie *Bacillus subtilis*. O meio foi distribuído em placas de Petri e autoclavadas a 121°C por 15 min, fez-se o ajuste do pH final para 7,0. Os microrganismos foram cultivados em estufa por 5 dias com temperatura controlada de incubação de 32 ° C.

3.3.3.2 Fungos

Para fungos foi usado o meio PDA (Batata dextrose Agar – fabricante Himedia Lab. Put. Ltda) contendo extrato de batata, glicose e Agar. Pesados os ingredientes em balança semi-analítica, 39g/L foram dissolvidos em água destilada e dispensados em placas de Petri,

auto-clavados a 15 min/121°C com ajuste de pH para $5,6 \pm 0,2$. Os microrganismos foram cultivados em estufa por 5 dias com temperatura controlada de incubação de 32 ° C.

3.3.4 – Preparo dos esporos

Os esporos adquiridos na fundação André Tosello foram transferidos dos tubos de ensaio liofilizados para os meios incubados por cinco dias em estufa a 30 °C, constituindo o primeiro repique. O segundo repique foi obtido de forma similar ao primeiro partindo dos esporos do primeiro. Para suspensão dos esporos foram utilizados 10 mL da solução dispersante de Tween 80 na concentração 0,3% (v/v) adicionado e homogeneizado com alça de platina nas placas de Petri de segundo repique. A quantificação da suspensão de esporos foi feita através da contagem dos esporos em câmara de Neubauer espelhada (Santos, 2007). O volume de suspensão de esporos foi ajustado e adicionado ao meio de fermentação de modo a ter-se uma concentração de 10^7 esporos por grama de substrato sólido ou líquido.

3.3.5 - Obtenção do pré-inóculo

No preparo do pré-inóculo utilizou-se o substrato, farelo de trigo e os resíduos da margarina como fonte de carbono segundo Santos (2007).

O farelo de trigo foi testado com todas as cepas disponíveis em triplicata. No preparo dos esporos foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL, adicionados de 4,6 g de substrato e 6,0 mL da solução umidificante contendo: 2,8 g de peptona dissolvida em água destilada + 0,19 mL solução A (20 g de fosfato monobásico de potássio dissolvido em 100 mL de água destilada) + 0,025 mL solução B (3,96 g de sulfato de zinco, 4,6g de sulfato ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico) segundo, Xiong *et al.*(2004). Após homogeneização, os mesmos foram esterilizados em autoclave por 1 hora a 1 atm. Em seguida, transferiu-se 10^7 de esporos filtrado em gaze estéril para cada Erlenmeyer que foram agitados e incubados em estufa a 32 °C por um período de cinco dias.

Após este período os frascos que apresentaram desenvolvimento microbiano e produção de esporos foram refrigerados e utilizados como inóculo nos ensaios.

Para os resíduos da margarina foram adicionados em Erlenmeyers de 125 mL, 4,6 g de substrato e 6,0 mL da solução umidificante, Xiong *et al.* (2004).

3.3.6 – Preparo do inóculo

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 250 mL contendo 12 g de resíduo seco do farelo de trigo. Para garantir uniformidade das amostragens o resíduo foi preparado de acordo com a matriz de planejamento experimental Tabela 3.2, em béquer, adicionando-se lentamente água destilada ao resíduo de farelo (não lavado, não auto-clavado e tratado com dióxido de cloro antes da moagem do trigo) e homogeneizado até atingir a unidade planejada (Santos, 2007).

O resíduo de farelo de trigo foi pesado e distribuído nos Erlenmeyers. O tratamento prévio adotado, não lavado e não auto-clavado, bem como a estratégia de preparo do inóculo, tiveram como base informações da literatura de Caballero (2006) e Guedes (2010). Neste meio, o substrato foi a única fonte de carbono induzindo o crescimento de organismos produtores de enzimas para o consumo da hemicelulose.

Os ensaios controle foram conduzidos nas mesmas condições. A inoculação foi realizada na câmara de fluxo laminar e o substrato após receber o pré-inóculo foi enviado à câmara de fermentação estática a temperatura de 32 °C para cultivo.

Os resíduos da margarina já não foram utilizados nesta etapa porque os ensaios realizados com resíduos puros e sem tratamento da refinaria de margarina e ETE não apresentaram crescimento microbiano.

3.3.7 Processo FES para produção de enzimas

Como os cultivos com farelo de trigo apresentaram crescimento e boa atividade xilanásica quando utilizou-se o *Aspergillus orizae*, este foi o único utilizado nos ensaios de FES .

O processo de fermentação em estado sólido foi conduzido utilizando 12,0 g do farelo de trigo nas seguintes condições de pré-tratamento: não lavado e não autoclavado (NLNA), lavado e autoclavado (LA), não lavado e autoclavado (NLA), em frascos de 250 mL, com umidade 40%, pH = 3,3 e granulometria de 900 μm . Nos ensaios 12,0 g dos resíduos foram adicionados de 1,0 mL pré-inóculo e foram incubados a 32 °C por 168 h (Santos, 2007).

Foram estabelecidas novas condições de melhor crescimento microbiano com utilização de 10,0 mL de inóculo sugeridos por Xiong *et al* (2004), ao invés de 1 mL ou da contagem de esporos. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para realização das análises de pH, umidade, açúcares redutores (AR) e proteína, por 120 horas (5 dias). Totalizando uma retirada de 7 g de amostragem. O restante serviu para extração do complexo enzimático e medida da sua atividade. Como os dois ensaios com adição de 1500 μL de sulfato de amônio e 1% de peptona não foram bem sucedidos, os ensaios seguiram sem adição de nutrientes.

3.3.8 – Planejamento experimental para identificação das condições ótimas de cultivo

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado e permitiu avaliar a influência dos três fatores (variáveis independentes): pH do meio, granulometria e percentual de umidade na produção de xilanases por fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substrato e o microrganismo *A.oryzae*. Nesse caso, os fatores estão descritos nas matrizes da Tabela 3.2 e 3.3 e utilizou-se como resposta (variável dependente) a atividade xilanásica (UI/mL) sendo correlacionada a (UI/g) pela utilização do fator de correção, como será apresentado no cálculo da atividade enzimática.

Nesse delineamento a parte fatorial consistiu de 8 ensaios, com três repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios (Barros Neto, 2007) que, juntamente com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permitiu localizar o ponto ótimo de atividade. Os resultados do planejamento foram avaliados usando-se o software *Statistica* (v. 7.0 – Stasoft/USA) que permitiu obter os modelos estatísticos.

A Tabela 3.2 apresenta os fatores utilizados, sua codificação e os níveis estudados, no DCCR.

Tabela 3.2 – Delineamento Composto Central Rotacional: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e seis ensaios axiais com rotabilidade.

Fatores/Codificação	Níveis Codificados				
	$(-\alpha = -1,682)$	(-1)	0	$(+1)$	$(+\alpha = +1,682)$
pH/ X_1	3,3	4	5	6	6,7
Granulometria(μm)/ X_2	395	600	900	1200	1404
Umidade (%)/ X_3	23,2	30	40	50	56,8

Tabela 3.3 Delineamento Composto Central com Rotabilidade (DCCR) para otimização da produção de xilanases por *A. oryzae* usando farelo de trigo como substrato

Ensaio	Fatores codificados		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	$-\alpha$	0	0
13	$+\alpha$	0	0
14	0	$-\alpha$	0
15	0	$+\alpha$	0
16	0	0	$-\alpha$
17	0	0	$+\alpha$

3.4 - Extração da enzima xilanase

Na extração da enzima utilizou-se 5,0 g da amostra dos cultivos que foram lavados com 40 mL de solução tampão Acetato de sódio 100 mM em pH 5,0. A extração ocorreu em banho-maria a 30 °C por 30 min. Em seguida, centrifugou-se 2700 xg por 10 min a 30°C, filtrou-se e a solução foi armazenada a temperatura de 4°C. Tais extratos foram utilizados

posteriormente para determinação de açúcares redutores totais, percentual de proteínas e atividade enzimática xilanásica.

A avaliação das condições de extração foi investigada por ensaio no qual o tampão acetato de sódio foi substituído por água destilada no momento da extração da enzima. Mantiveram-se os demais parâmetros de melhor resultado no planejamento estatístico neste ensaio sendo: umidade do substrato (50,0%), quantidade de inóculo (10,0 mL), pH (4,0) e granulometria (1200,0 µm). As condições de extração também foram mantidas: volume de líquido de extração 40,0 mL, em banho termostático a 30 °C por 30 min e centrifugação a 1700 rpm por 10 min seguida por filtração.

3.5 - Determinação do percentual de proteína no caldo fermentado pelo método de Bradford

Com as amostras do caldo enzimático obtido pela FES, do farelo de trigo por *Aspergillus orizae*, preparou-se uma solução de diluição adequada com absorbância no intervalo de leitura da curva de calibração. Lêu-se a amostra contra água destilada e a partir da absorbância calculou-se, com a ajuda da equação da curva de calibração, a concentração da amostra. Considerou-se eventuais diluições feitas.

Este método baseia-se no fato do corante ácido *Coomassie Brilliant Blue G 250* ter uma cor vermelha, que muda para azul quando está ligado a uma proteína. Para determinação de amostras com concentrações entre 0,1-1,4 mg/mL de proteína, misturou-se 5 mL do reagente Coomassie, com ajuda de uma micropipeta, com 100 µL de solução de proteína e foram lidas as densidades ópticas, a 595 nm, contra um branco (5 mL de reagente Bradford + 100 µL do tampão usado). Como a absorbância das soluções de proteína com corante Coomassie, inclusive a do branco tendem a aumentar com o tempo, devido à adsorção do corante ácido na cubeta, é preferível medir todas as soluções contra água destilada. A absorbância da água não muda com o tempo. O valor do branco das outras soluções foi descontado nos cálculos de todas as triplicatas realizadas (Zaia *et al.*, 1998).

3.6 - Determinação da atividade enzimática

O método utilizado determinou a provável atividade enzimática da xilanase nas amostras através da quantificação da concentração de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da xilana pela xilanase à D (+) xilose, utilizando-se xilose Sigma Aldrich (C₅H₁₀O₅) como padrão.

A metodologia utilizada foi conforme descrita por Ghose (1986). Determinou-se concentração de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da xilana 1% (*xylan from birch wood* - X0502) em espectrofotômetro (Termospectromic, Gensys 10 UV), pré-incubada 10 min a 50 °C em banho – maria (Nova instruments, NI1232). Definiu-se a atividade como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 μmol de xilose/min, nas condições do ensaio. Realizada a determinação de açúcares redutores pelo método do DNS, (Miller, 1959). Dois controles foram efetuados como descritos a seguir:

Tempo zero:

Realizado para determinar a concentração de açúcares redutores no sobrenadante, antes da ação da enzima na xilana. Adicionando-se 0,5 mL do sobrenadante em tubos contendo 0,5 mL de tampão acetato de sódio. Após agitação transferência de 0,5 mL da solução obtida para tubos contendo 0,5 mL de reagente DNS

Branco:

Realizado para zerar o espectrofotômetro. Adicionando 0,5 mL de xilana 1% e 0,5 mL de reagente DNS.

O cálculo da atividade enzimática das xilanases foi realizado em UI/mL e convertido para UI/g através da Equação (9), descrita abaixo.

$$\text{A determinação atividade enzimática UI/g} = \frac{E_{\text{dil}} * \Delta\text{Abs} * F(\mu\text{mol/mL}) * V_T(\text{ml}) * R(\text{mL/g})}{t(\text{min}) * V_s(\text{ml})} \quad (9)$$

ΔAbs = variação da absorbância;

E_{dil} = diluição necessária;

- F = fator da curva padrão de xilose;
- V_T = volume total da mistura reacional;
- t = tempo de reação;
- V_s = volume de sobrenadante;
- R = razão volume tampão/ massa de resíduo.

3.7 - Determinação dos açúcares redutores

Preparou-se as soluções contendo diferentes concentrações de xilose dentro da faixa de sensibilidade do método (método químico = 1-20 μ moles de xilose/mL). Adicionou-se 0,5mL das soluções a 0,5mL de reagente DNS. Realizou-se a determinação de açúcares redutores conforme procedimento descrito a seguir. Lançou-se em um gráfico as leituras de absorvância versus a concentração de xilose conhecida para a obtenção da curva padrão. A equação da reta forneceu o fator de conversão para se calcular a concentração de açúcares redutores analisados.

3.7.1 - Método do ácido Dinitrosalicílico (DNS)

Colocou-se as amostras, o branco e o tempo zero em água fervente (100 °C) por 5 minutos, resfriando em banho de gelo e completando o volume a 7,5 ml com água destilada em cada tubo, agitando até homogeneizar a solução. Usando o branco para zerar o espectrofotômetro, determinou-se as absorvâncias das amostras a 540nm.

3.8 - Análises de identificação do caldo enzimático

3.8.1 - Determinação do ponto isoelétrico e eletroforese “SDS-PAGE”.

A determinação do ponto isoelétrico foi realizada a partir da adição de 1 mL da amostra do caldo extraído da FES a 1 mL do tampão. Para representar variação de pH de 3,0-6,0 utilizou-se 1 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M, para pH 6,5 a 8,0 utilizou-se tampão fosfato de sódio 0,1 M, para pH de 8,5 a 10,0 utilizou-se tampão bicarbonato-carbonado 0,1M (Arduengo, 2010). Após contato de 2 horas com cada tampão no pH desejado foi verificada a

precipitação da enzima. Realizou-se a análise de atividade enzimática e eletroforese das amostras do sobrenadante (Laemmli, 1970).

Para eletroforese sob condições desnaturantes aplicou-se 25,0 μ L da amostra no gel submerso no tampão. Utilizou-se o método de coloração com solução de azul de Coomassie e nitrato de prata (Laemmli, 1970).

3.8.2. Estabilidade da enzima

A determinação do período de conservação da atividade da enzima xilanase nos formulados enzimáticos foi determinada avaliando-se o caldo enzimático a cada 15 dias durante 3 meses e aos 6 meses de obtenção da enzima.

No caldo enzimático foi também avaliada a estabilidade em diferentes temperaturas, deixando 2 mL do caldo enzimático em banho-maria por 1 hora em temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C. Após o período determinado e a temperatura avaliada, a atividade enzimática foi determinada conforme o item 3.6.

3.8.3 – Aplicação do extrato enzimático- Análise *falling number* ou número de queda

Esse ensaio permite determinar a atividade enzimática em uma farinha de trigo, baseado no parâmetro número de queda ou *Falling number* (FN), método ICC nº107. Trata-se de um método viscosimétrico que mede o efeito da enzima nas propriedades do amido da farinha durante o processo de aquecimento e gelatinização. Os ensaios foram realizados com equipamento Falling Number (marca Perten, modelo 1900), utilizando valores de umidade da farinha com a tabela de conversão fornecida pelo fabricante, para obter a massa à ser pesada da amostra.

Utilizou-se 1,0 e 2,0 mL do caldo enzimático obtido para avaliar se ocorria alteração significativa em 7,0 g da farinha padrão com umidade 13,5%, sendo considerada significativa uma variação maior que 50 unidades do número de queda.

3.8.4 Análise de alveografia

Trata-se da avaliação das propriedades reológicas da farinha de trigo registrada por curvas de extensão, sob pressão de um volume de ar determinado, em massas testes tensionadas até a quebra. O método alveográfico consiste em preparar massa da farinha de trigo com solução de cloreto de sódio com absorção padrão de 56%, com mistura e preparo padronizados. Feito um disco, o mesmo é inserido na câmara de fermentação, depois na câmara de expansão e inflado sob pressão constante suficiente para formação de uma bolha até registro de sua extensão total, pressão e ruptura. Os parâmetros avaliados foram: tenacidade, que exprime a resistência à deformação (P), extensibilidade que correspondente à queda de pressão devido à ruptura da bolha medida sobre a linha de pressão zero, da origem da curva ao ponto vertical (L), configuração e equilíbrio da curva (P/L), trabalho e energia de deformação (W) em (10^{-4} J), medida da força mecânica necessária à deformação de 1,0 g de amostra inicial em condições definidas até a ruptura segundo metodologia ICC N° 121 (1992)

Portanto, para avaliação da reologia da massa tratada com a enzima obtida pela fermentação do microrganismo *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de trigo como substrato em condições otimizadas foi realizado ensaio com alveógrafo marca Chopin modelo 6374, adicionando-se volumes variados do caldo enzimático a 250,0 g de farinha de trigo até conseguir reconhecer alterações dos parâmetros comparadas com a carta alveográfica da farinha pura. A quantidade necessária do caldo que permitiu uma variação de tipificação foi 71,5 mL.

Capítulo 4

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

A seguir são apresentados os resultados das análises de caracterização de cada resíduo, o melhor microrganismo produtor de enzima, os resultados de otimização do processo de fermentação, as condições de extração da enzima, análise de sua estabilidade, sua caracterização e avaliação de aplicação.

4.1 – Bioprospecção e caracterização dos resíduos da produção de margarinas

Para os subprodutos borra da margarina e da estação de tratamento de efluentes, a caracterização dos resíduos semi-pastosos foi realizada pelo laboratório terceirizado IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas em São Paulo, classificando-os de classe II e inertes que possibilitam manuseio seguro e seu aproveitamento em processos biotecnológicos.

Na bioprospecção microbiana, o laboratório da Fundação André Tosello/SP não detectou crescimento microbiano nos resíduos da produção de margarina, não sendo isolado nenhum microrganismo neste substrato. No caso do resíduo da refinaria o fato provavelmente ocorreu por na etapa de secagem ocorrer tratamento térmico esterilizando o resíduo, e no caso dos resíduos da ETE provavelmente por receber na etapa de desodorização vapor e tratamento com hidróxido de sódio.

A análise de hidrólise para caracterização do resíduo da refinaria revelou presença de um produto de condensação de ácidos carboxílicos com glicerol preponderante e pequenas proporções de etilenoglicol com umidade de 47%. Na análise de ácidos carboxílicos foi identificada a presença dos compostos descritos na Tabela 4.1. Os maiores percentuais encontrados são referentes ao ácido palmítico e ácido oléico.

Tabela 4.1- Teor de compostos orgânicos encontrados somente no resíduo da refinaria.

Compostos	Teor (%)
Ácido octanóico (caprílico) (C ₈ H ₁₆ O ₂)	0,7 ± 0,2
Ácido láurico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	1,0 ± 0,1
Ácido mirístico (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	0,9 ± 0,1
Ácido palmítico (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	40,0 ± 0,4
Ácido linolêico (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	1,4 ± 1,0
Ácido oléico (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	46,6 ± 0,7
Ácido esteárico (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	9,4 ± 0,4

Contudo, nos ensaios preliminares utilizando os microrganismos *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* e *Bacillus subtilis*, e resíduos da fabricação de margarina como substrato (Figura 4.1), nenhum crescimento microbiano foi observado, indicando que o resíduo não apresentou potencial como substrato para produção de enzimas pelos microrganismos testados. Descartando-se portanto estes resíduos na sequência deste trabalho.



Figura 4.1 – Observação do crescimento microbiano no resíduo da ETE à esquerda, seguido do resíduo da refinaria, resíduo farelo de trigo NLNA e farelo de trigo LA.

4.2 - Caracterização do resíduo de farelo de trigo

O resíduo farelo de trigo apresentou umidade de 12,5%, granulometria de 600 µm para o farelo fino, 1200 µm para o farelo grosso e a mistura de farelos apresentou 900 µm. Na avaliação do pH em média detectou-se valores entre 6,0 e 7,0. Com relação a densidade do farelo com granulometrias determinadas acima observou-se resultados de 98,9, 84,34 e 74,5 g/L respectivamente, o que segundo Lewis (1993) depende de fatores variados como: geometria, granulometria e métodos de medição. Resultando em diferenças na viscosidade do caldo extraído, absorção de água e dissipação do calor na fermentação.

Compostos orgânicos (celulose, hemicelulose e lignina) presentes no farelo de trigo analisados estão apresentados a seguir:

Tabela 4.2 – Percentuais de celulose, hemicelulose e lignina do farelo de trigo.

Amostra	Celulose(%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)
Farelo de trigo lote 2012.1	30,04 ±2,97	43,63 ±2,0	11,97±0,76
Farelo de trigo lote 2012.2	27,24 ±2,57	40,58 ±3,2	14,34±0,11

Os resultados dos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina são diferenciados nas duas amostras por se tratar de amostras de cargas de navios de trigos diferentes. Estes percentuais indicam ser o farelo de trigo potencial substrato para síntese de xilanases pois o maior valor determinado foi o de hemicelulose.

Quanto a percentuais de compostos orgânicos de farelo de trigo pesquisados na literatura, Carvalho (2007) apresentou resultados de 31; 26 e 24%, para a celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente; Canilha *et al.* (2002), 30; 24 e 18%; Kuhad *et al.* (2004) , 26 e 24%, e Wang *et al.* (2011) relata valores de 43 a 52; 23 a 30 e 9,8 a 14,4%. Os percentuais de hemicelulose identificados no presente trabalho são mais elevados que os reportados na literatura com farelo de trigo similar, enquanto que os teores de lignina são inferiores e teores de celulose similares. O que pode se atribuir ao fato do trigo ser originado de diferentes espécies de plantas com diferenças genéticas, fruto de contribuições diferenças

climáticas e de solos. Como o farelo possui elevado teor de hemicelulose, correspondente a cerca de 40% e devido ao baixo teor de lignina (11-14%) não foi adotado pré-tratamento do material.

Com relação a proteínas totais, encontrou-se um valor médio de 14,5% \pm 0,50 neste trabalho. Brijwani *et al.* (2010) relatam um percentual de proteína de 16,29 % \pm 0,06, portanto próximo ao encontrado no presente trabalho. Os percentuais de cinzas apresentaram valores entre 11,5- 14,6%, acima dos valores citados na literatura de 10 % por Kuhad e Singh (1993) e 7% por Scheuer *et al.* (2011) Indicando ser o substrato utilizado neste trabalho mais rico em proteína, porém de coloração mais escura devido ao aumento de cinzas.

4.3 – Seleção de microrganismos e tratamento do substrato

Do farelo de trigo da unidade fabril foi isolada cepa de *Aspergillus oryzae* que não apresentou crescimento significativo, sendo descartada. Adquiriu-se as culturas de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma reesei*, da Fundação André Tosello, formando também o consórcio *Trichoderma reesei* + *Aspergillus oryzae*.

No ensaio de pré-inóculo o microrganismo que apresentou melhor desempenho na FES foi o *Aspergillus oryzae*, adquirida da coleção de cultura da Fundação André Tosello em cultivo sem adição de nutrientes, em frasco erlenmeyer de 250 mL, granulometria de 600 microns e inóculo de 10 mL. O mesmo apresentou crescimento exuberante no farelo de trigo não lavado e não autoclavado (NLNA). No resíduo fermentado percentual de proteína que saltou de aproximadamente 14,0% para 20,5% no primeiro dia de fermentação. Nos demais microrganismos a variação não ultrapassou 1%, logo os demais foram descartados.

Através de determinação do percentual de proteína total no extrato após a fermentação e a determinação da atividade enzimática avaliou-se os microrganismos com melhor adaptação ao consumo do substrato por tipo de tratamento e melhor microrganismos na FES por sete dias. Conforme os resultados apresentados na Tabela 4.3 a utilização do farelo NLNA com o microrganismo *Aspergillus oryzae* apresentou o melhor resultado em percentual de

produção de proteína no primeiro estágio de adaptação do microrganismo (72 horas ou 3 dias).

Por investigação da atividade enzimática confirma-se representação deste percentual como sendo aumento na produção da proteína de interesse e não de rota de crescimento de massa microbiana. Para os demais microrganismos o valor de atividade enzimática não ultrapassou 1,0 UI/g.

Os melhores resultados de atividade enzimática entre $2,35 \pm 0,02$ e $4,56 \pm 0,01$ foram obtidos nos ensaios realizados com o farelo não lavado e não auto-clavado, provavelmente resultante do esforço do microrganismo em consumir o único substrato disponível para sua sobrevivência.

Tabela 4.3 – Resultados no caldo fermentado na análise de proteína, açúcares redutores e atividade enzimática na escolha do microrganismo. Fermentação de 7 dias por *Aspergillus oryzae* com 10 mL de inóculo, farelo com granulometria 900 μm , pH 6, temperatura de 32 °C e umidade de 13,6%.

Tempo (dias)	Proteína (mg/mL)	AR (mg/mL)	AE(UI/g)
1	$3,54 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,00$	$4,56 \pm 0,01$
2	$3,95 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$2,35 \pm 0,02$
3	$4,15 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,02$	$2,82 \pm 0,01$
4	$3,87 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,00$	$0,61 \pm 0,14$
5	$3,51 \pm 0,10$	$0,28 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,03$
6	$3,73 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$
7	$3,40 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$

Considerando os resultados obtidos na fermentação por *A. oryzae* com farelo de trigo NLNA, observa-se que o pH inicial de 5,8 a partir das 96 horas de fermentação (4º dia), tende a neutralização. Este é um indicador de início da etapa de multiplicação do microrganismo, corroborando com a observação visual de crescimento micelial exuberante. Torna-se

perceptível para este estudo quando cruzados os dados de atividade enzimática que existe a etapa de redução da produção enzimática neste momento e o início da dedicação do microrganismo à fase de multiplicação. Industrialmente este ponto de neutralização indica o momento de realizar a extração para otimização dos esforços de concentração ou purificação da enzima.

A seguir serão apresentados os resultados da otimização do processo, através de um delineamento experimental, sendo escolhidos três parâmetros como variáveis independentes: granulometria, umidade e pH, variáveis identificadas como primordiais na revisão bibliográfica.

4.4 – Otimização das condições de cultivo por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A Tabela 4.4 ilustra os resultados obtidos pelo DCCR para otimização da produção de xilanases por *A. oryzae* usando farelo de trigo NLNA como substrato indutor para a produção da xilana. O melhor resultado de atividade enzimática foi obtido no ensaio de número 12, após a rotabilidade, com pH 3,3, granulometria 900 µm e umidade de (40%).

Tabela 4.4 – Atividade enzimática do delineamento Composto Central com Rotabilidade (DCCR) para otimização da produção de xilanases por *A. oryzae* usando farelo de trigo NLNA como substrato.

Ensaio	Fatores codificados			Resultados	
	X ₁ (pH)	X ₂ (Granulometria)	X ₃ (Umidade)	AE (UI/mL)	AE(UI/g) Fator R = 40 mL/12 g
1	-1	-1	-1	0,313 ±0,002	1,042 ±0,002
2	-1	-1	+1	0,530 ±0,002	1,764 ±0,002
3	-1	+1	-1	0,237 ±0,004	0,789 ±0,004
4	-1	+1	+1	1,516 ±0,010	5,048 ±0,010
5	+1	-1	-1	0,645 ±0,001	2,148 ±0,001
6	+1	-1	+1	0,079 ±0,009	0,263 ±0,009
7	+1	+1	-1	0,282 ±0,006	0,939 ±0,006
8	+1	+1	+1	0,069 ±0,004	0,229 ±0,004
9	0	0	0	0,043 ±0,012	0,143 ±0,012
10	0	0	0	0,040 ±0,005	0,133 ±0,005
11	0	0	0	0,041 ±0,015	0,136 ±0,015
12	-α	0	0	3,54 ±0,012	11,788 ±0,012
13	+α	0	0	0,182 ±0,003	0,606 ±0,003
14	0	-α	0	0,344 ±0,013	1,145 ±0,013
15	0	+α	0	0,349 ±0,010	1,162 ±0,010
16	0	0	-α	0,051 ±0,002	0,169 ±0,002
17	0	0	+α	0,081 ±0,005	0,269 ±0,005

A Figura 4.2 ilustra o diagrama de Pareto para o DCCR. Observa-se que os efeitos principais e as interações de segunda ordem foram todos significativos, com 95% de confiança. Destacou-se a influência maior do pH, tanto o termo linear como o termo quadrático e também a interação entre pH e a umidade. Observou-se que a diminuição do pH favorece à produção da enzima. O fato de todos os efeitos principais dos fatores bem como as interações de segunda ordem mostrarem valores significativos ratifica a complexidade da regulação da expressão gênica no cultivo em estado sólido.

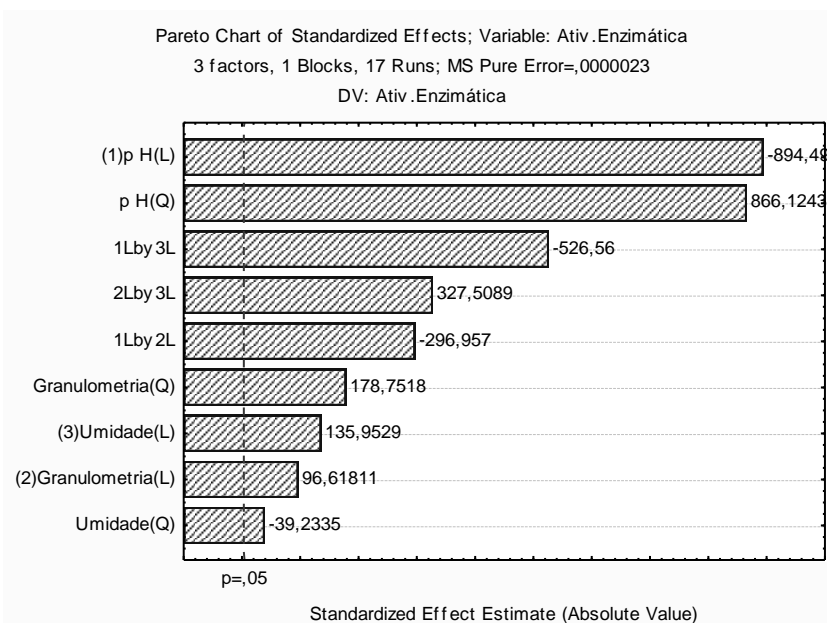


Figura 4.2 - Diagrama de Pareto para o DCCR, com nível de (95%) de confiança, para produção de xilanases por *A. oryzae* usando farelo de trigo como substrato em FES

Um modelo matemático foi proposto, conforme Equação (9), que permite prever a atividade xilanásica obtida ao se utilizar como substrato farelo de trigo inoculado com *A. oryzae* CCT n° 0975 - ATCC 9362 por FES.

$$AE = 0,049 - 0,3697X_1 + 0,0399X_2 + 0,0562X_3 + 0,3941X_1^2 + 0,0813X_2^2 - 0,0178X_3^2 - 0,1603 X_1X_2 - 0,2843 X_1X_3 + 0,1768 X_2X_3. \quad (9)$$

Onde:

$X_1 = \text{pH};$

$X_2 = \text{granulometria e};$

$X_3 = \text{umidade}.$

O modelo consegue explicar (86,7 %) de toda variação em torno da média. A Figura 4.3 ilustra os valores preditos e os valores observados ao se utilizar esse modelo. Observou-se que, considerando a complexidade da FES, foi obtido um bom ajuste.

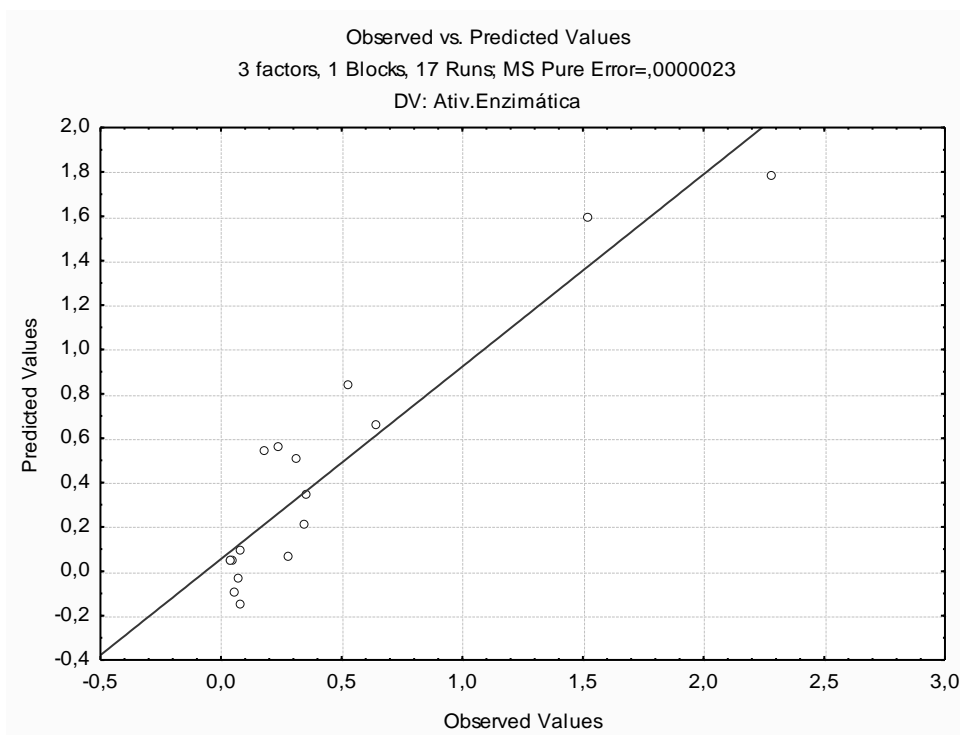


Figura 4.3 – Valores preditos em função dos valores observados para a atividade xilanásica obtida pelo DCCR ao se utilizar farelo de trigo como substrato e o fungo *A. oryzae* em FES

A Figura 4.4 ilustra a superfície de resposta para o DCCR. Dessa forma, com os parâmetros pH igual a 3,3, umidade (40,0 %) e granulometria 900,0 μm foi encontrado o valor máximo de atividade enzimática de 3,54 UI/mL máximo ou 11,19 UI/g.

O gráfico de Pareto demonstrou que o parâmetro granulometria apresentou um efeito positivo sobre a produção enzimática. O que pode ser explicado pela formação de grumos, que podem dificultar a aeração comprometendo o crescimento do fungo, produção da enzima e extração. O crescimento filamentosso aglomerado devido a reduzida granulometria contribui também para o aumento da temperatura. Conforme relatado por Fernandez (2009) ao se reduzir a granulometria dificulta-se a aeração e conseqüentemente o crescimento das hifas.

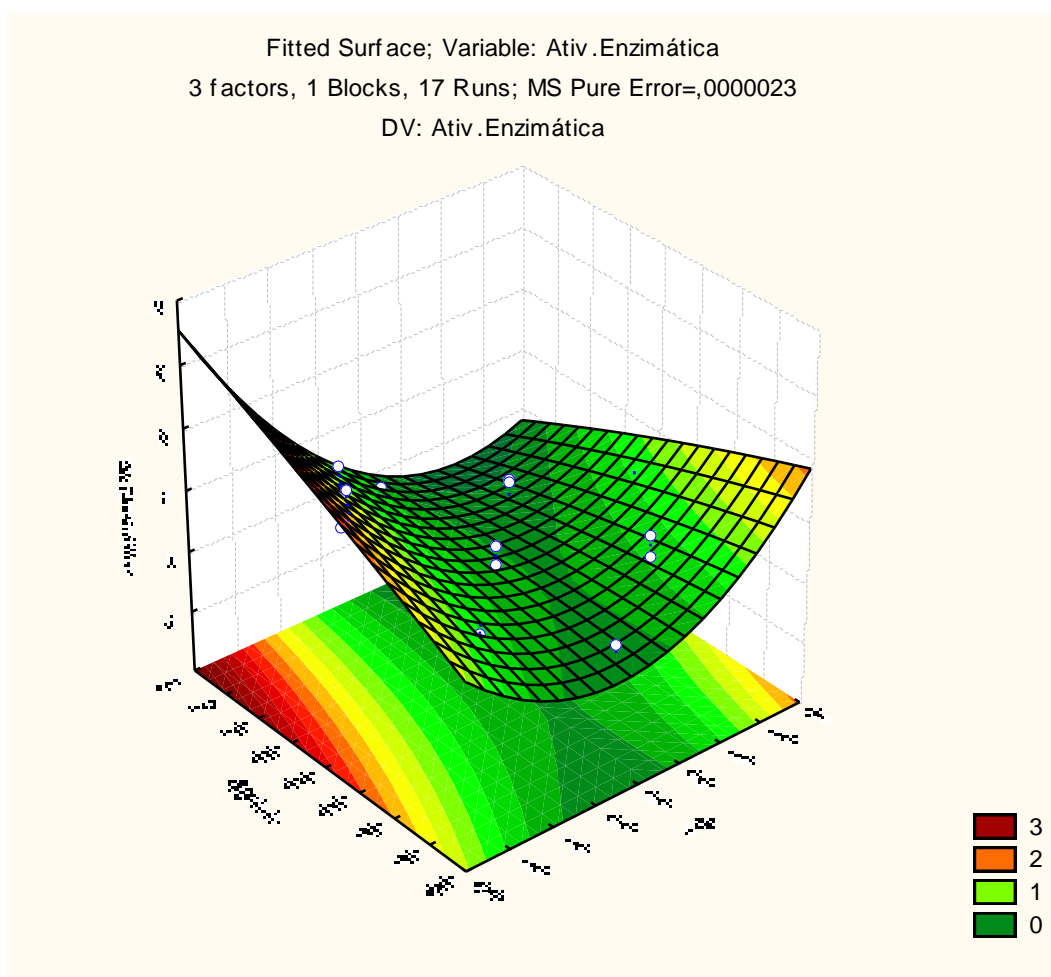


Figura 4.4 - Superfície de resposta do DCCR da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae* à 32 °C e granulometria 900µm - ponto central

4.5 - Teste das condições de extração.

A Tabela 4.5 apresenta os dados obtidos do comparativo da atividade enzimática com os dois líquidos de extração utilizados, tampão Acetato de sódio 100 mM com pH 5 e água.

Tabela 4.5 - Comparativo da extração por avaliação da atividade enzimática do ensaio preliminar de fermentação em estado sólido do farelo de trigo por *A. oryzae* com pH 4,0, umidade (50%) e granulometria 1200 μm .

Dias	AE (UI/g) extraída com tampão	AE (UI/g) extraída com água
1	0,076 \pm 0,002	0,146 \pm 0,008
2	1,964 \pm 0,001	0,113 \pm 0,004
3	4,255 \pm 0,001	0,103 \pm 0,014
4	5,028 \pm 0,016	0,216 \pm 0,007
5	4,329 \pm 0,001	0,606 \pm 0,039

Os dados apresentados acima confirmam a expectativa de maior estabilidade na extração quando realizada com o tampão, fator que mantém o pH estável. O fato também foi relatado por Taraboulsi-Jr *et al* (2010), ao pesquisar os fatores que afetam a atividade enzimática. Descreveu a perda enzimática verificada em decorrência de variações de temperatura e pH atuando por toda a estrutura da macromolécula, fragilizando-a em diferentes pontos da estrutura e causando modificações de ligação que acumuladas no tempo, apresentam efeitos sinérgicos deformadores que reduzem seu desempenho catalítico.

4.6 – Estabilidade do caldo enzimático

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados da avaliação de estabilidade da enzima. Observando os valores da atividade enzimática e comparando os dados da enzima analisados no dia de sua produção nota-se que a atividade permanece em valores similares durante 15 dias quando conservada a 4 °C e posteriormente até três meses apresentou o equivalente a (52,96%) da atividade após sua obtenção.

Relata-se que a mistura de ingredientes para correção da farinha denominada Germix possui validade de 7 meses e apresenta como veículo o amido de milho e como antiemectantes o carbonato de cálcio e o dióxido de silício. Sua recomendação de dosagem é de (0,12%) sobre a farinha de trigo. Fatores que certamente influenciam na sua estabilidade.

Ressaltando que sua atividade nesta dosagem recomendada foi próxima ao obtido neste experimento. O que nos leva a crer que mesmo com o decréscimo considerável de atividade sua aplicação continua obtendo resultados de aplicação viáveis.

Tabela 4.6. Resultado da estabilidade da atividade enzimática após 3 meses de armazenagem a 4 °C . Comparativo com produto comercial.

Produto/condição de armazenagem	Atividade enzimática (UI/g)
Atividade inicial	5,06 ±0,12
15 dias de armazenagem 4°C	6,13 ±0,01
30 dias de armazenagem 4°C	2,16 ±0,04
45 dias de armazenagem 4°C	2,36 ±0,00
60 dias de armazenagem 4°C	2,59 ±0,02
75 dias de armazenagem 4°C	2,56 ±0,02
90 dias de armazenagem 4°C	2,76 ±0,02
Enzima obtida no DCCR	11,78 ±0,01
Enzima commercial diluída a 1% (Germix, xilanase 45-66 KDa)	2,59 ±0,02

Comparando os resultados da enzima obtida no DCCR observa-se que está acima do valor de atividade necessário utilizado na enzima comercial testada.

Na análise da estabilidade pela permanência de 1 hora da amostra do caldo bruto enzimático em temperaturas programadas de 40 a 70 °C observou-se na Tabela 4.7 estabilidade do caldo até os 55 °C e perda da atividade xilanásica ao permanecer em temperatura acima de 60°C. Ocorrendo, portanto a confirmação de que como a maioria das enzimas a partir de 60°C o caldo apresenta perda de atividade pela desnaturação da proteína.

Tabela 4.7 – Estabilidade da enzima avaliada pela atividade enzimática em variadas temperaturas. Atividade inicial de 5,49 (UI/g).

Temperatura (°C)	AE (UI/mL)	AE (UI/g)
40	1,65 ±0,01	5,49 ±0,01
45	1,50 ±0,01	4,99 ±0,01
50	1,48 ± 0,01	4,93 ± 0,01
55	1,58 ±0,02	5,26 ±0,02
60	0,09 ±0,01	0,29 ±0,01
65	0,05 ±0,02	0,16 ±0,02
70	0,02 ±0,01	0,07 ±0,01

Fernandez (2009) relata que a produtividade da xilanase obtida em meio sólido obteve valor máximo de $0,68 \text{ U/mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ após 96 h de fermentação, observando que ao se aumentar a temperatura acima de 30 °C aumenta-se o valor da constante de desnaturação de forma exponencial. As melhores condições de armazenagem para enzimas são sob refrigeração de 4 °C, após oito semanas de armazenagem, conservando acima de (80%) de sua atividade. Ao se utilizar a adição de uma solução de (35%) de glicerol como sugestão de estabilizante a mesma manteve (90%) da retenção da atividade.

Já na avaliação da influência do pH sobre a estabilidade da enzima observa-se pela Tabela 4.8 que nos intervalos de 6-6,5 e 9-10 a atividade enzimática é reduzida. No intervalo inicial provavelmente por representar o seu ponto isoelétrico e no pH fortemente básico por acarretar desnaturação da proteína.

Tabela 4.8. Influência do pH na atividade enzimática inicial do caldo bruto foi $6,12 \pm 0,01$ (UI/g).

Amostra do caldo em variados pH	Atividade enzimática (UI/g)
3,0	$3,86 \pm 0,02$
3,5	$4,53 \pm 0,03$
4,0	$3,66 \pm 0,05$
5,0	$4,03 \pm 0,02$
6,0	$0,03 \pm 0,01$
6,5	$0,19 \pm 0,08$
7,0	$5,52 \pm 0,02$
7,5	$4,99 \pm 0,01$
8,0	$4,19 \pm 0,01$
8,5	$4,06 \pm 0,01$
9,0	$0,16 \pm 0,01$
9,5	$0,23 \pm 0,00$
10,0	$0,49 \pm 0,01$

Lemos (2000) avaliando a estabilidade térmica de xilanases produzidas por *Aspergillus awamori* relata produção de endo-xilanase estável por 165 dias e decréscimo de (20 %) na atividade da β - xilosidade após 15 dias de estocagem a 4 °C. Comenta que a estabilidade térmica de endo-xilanases aumenta consideravelmente através da adição de polióis, principalmente xilitol 52 °C e sorbitol em concentrações de 2,0 M.

Kamat *et. al.* (2013) relata que a utilização de xilanases iniciou na década de 80 na preparação de ração animal e que mais tarde foi disseminada na indústria de alimentos, têxtil e papel, ressaltando sua aplicação na fabricação de pães, bebidas indústria química e farmacêutica. Afirma que a xilanase catalisa a hidrólise das xilanas sendo produzidas principalmente por microrganismos que participam de decomposição da parede celular de plantas e hidrólise de polissacarídeos juntamente com outras enzimas. Dentre as fontes

microbianas reflete que os fungos filamentosos são em especial utilizados, pois secretam xilanases para o meio em níveis mais elevados de que leveduras e bactérias. Realizou testes de temperatura ótima para enzimas pela incubação do extrato bruto a temperaturas que variam de 20 a 80 °C.

Milanezi (2010) pesquisando a purificação e caracterização de endoxilanasas produzidas por *Aspergillus niger* utilizando como substrato indutor bagaço de cana de açúcar revelou atividade xilanolítica com cerca de 33 kDa no melhor pH 4,5, nas temperaturas de 45 e 50 °C. Tendo como melhorador da atividade em (80%) o L-triptofano por ser modificador químico de aminoácidos. O tampão acetato de sódio pH 4,5 também foi capaz de aumentar a meia vida.

Na discussão de Santiago (2013) sobre a aplicação e termoestabilidade de enzimas quiméricas produzidas por FES comenta-se ser segundo Olofsson *et. al* (2008), enzimas com temperaturas ótimas próxima de 37 °C e pH próximo a 5,0 mais apropriadas para a produção de etanol de segunda geração.

Na avaliação de Xiong *et al.*(2004) estudando a influência do pH sobre a produção de xilanases por fungos filamentosos, a variação do mesmo proporciona a indução de produção de enzimas de massa molecular variada, o que torna o seu controle imprescindível industrialmente.

4.7 – Eletroforese (SDS-PAGE)

Na Figura 4.5 apresenta-se a identificação das proteínas por eletroforese revelada em gel de poliacrilamida 15% e desnaturadas em SDS. O extrato obtido no cultivo em estado sólido e do *A.oryzae* nas condições otimizadas descritas nesta pesquisa foi comparado com o extrato comercial utilizado na panificação pelo moinho GMP, denominada Germix obtida do microrganismo *Bacillus thunnigenis*, (Eurogerm Brasil produtos alimentícios LTDA). Evidenciou-se na identificação das bandas protéicas das colunas 1, 2, 5 e 6 a enzima comercial Germix, o caldo enzimático extraído da fermentação em estado sólido do farelo de trigo secretado por *Aspergillus oryzae* nas colunas 3 e 7; e visualiza-se os padrões de massas molecular nas colunas 4 e 8. Os números das bandas das corridas cromatográficas identificam que a enzima comercial germix é purificada e apresenta massamolar de 45 a 66 kDa, enquanto

o caldo obtido nesta pesquisa apresentou imagens em várias bandas protéicas, logo não purificado. Sendo mais intensa na região do extrato de massas molecular 14,4 kDa que se aproxima a representação do padrão da α - Lactalbumina (Sanagogo, *et al.*, 1989).

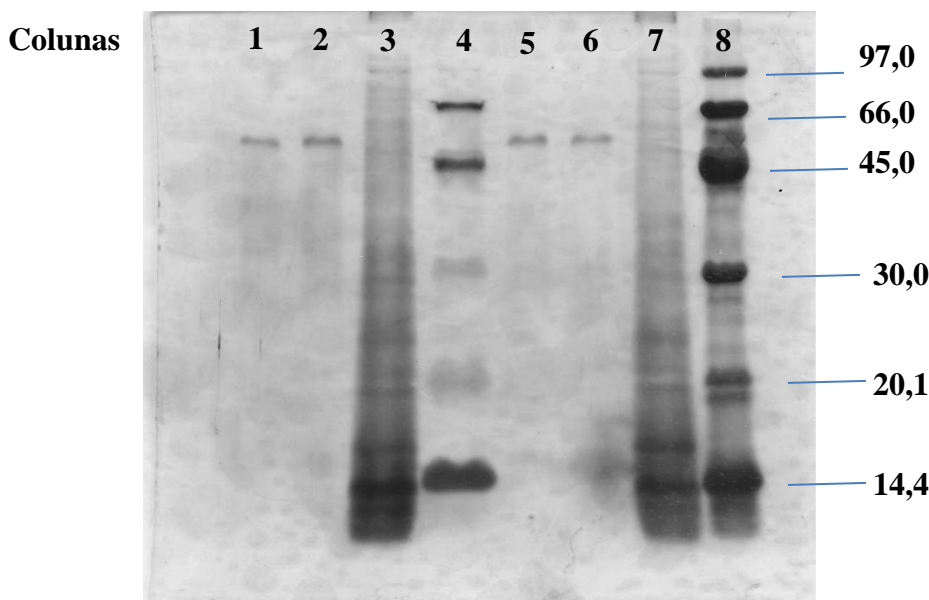
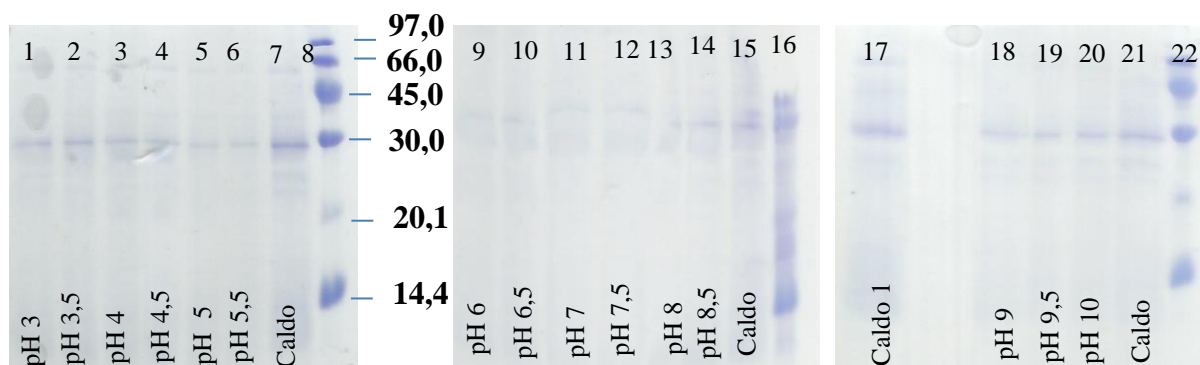


Figura 4.5 –Caracterização de proteínas secretadas no ensaio da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae*. O extrato bruto é apresentado nas colunas 3 e 7, enzima comercial denominada Germix colunas 1,2,5 e 6. Traçadores indicam os padrões comparativos de massas moleculares: 97,0 kDa - Fosforilase; 66,0 kDa - Albumina; 45,0 kDa – Ovalbumina carbônica; 30,0k Da – Anidrase; 20,1 kDa – Inibidor de tripsina e 14,4 kDa – α - Lactalbumina.

A avaliação do ponto isoelétrico apresentado na Tabela 4.6 através do resultado da atividade enzimática revelou que na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 a atividade no caldo é mínima indicando que as enzimas com atividade xilanolítica precipitam nesta faixa, portanto, nesta faixa está o ponto isoelétrico. Fato confirmado pela eletroforese na Figura 4.6 onde quase não pode ser visualizada bandas da corrida cromatográfica. A atividade da enzima é favorecida na faixa de pH entre 7,0 e 7,5, muito embora o desempenho no meio ácido não seja ruim. A atividade é novamente reduzida acima do pH 9,0 indicando a desnaturação da proteína.



Figuras 4.6 – Geis representativos da eletroforese do caldo bruto em contato por 2 horas com diferentes tampões. O extrato da proteína como caldo bruto denominado caldo 1 é apresentado na coluna 17, sua duplicata denominada caldo 2 é apresentada nas colunas 7,15 e 21. Padrões comparativos de massas moleculares nas colunas 8, 16 e 22: 97,0 kDa - Fosforilase; 66,0 kDa - Albumina; 45,0 kDa – Ovalbumina carbônica; 30,0 kDa – Anidrase; 20,1 kDa – Inibidor de tripsina e 14,4 kDa – α - Lactalbumina.

Na produção das endoxilanasas microbianas explicam que constituem-se de enzimas monoméricas com massas molecular entre 8 e 145 kDa usualmente apresentando atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60 ° C, denominadas mesófilas, pH ótimo de 4 a 7 e ponto isoelétrico variando de 3 a 10 segundo Kulkarni *et. al*, 2006. Apresentam a classificação da endoxilanasas da família 10 como sendo de alta massa molecular > 30 kDa e pI ácido e as da família 11 apresentando baixa massas molecular < 30 kDa e pI básico ou ácido. As endoxilanasas da família 11 atuam exclusivamente em substratos contendo resíduos de D-xilose, por isso são consideradas xilanasas verdadeiras. Trata-se de uma classificação baseada na comparação da estrutura primária dos domínios catalíticos proposto por Henrissat e colaboradores em 1993. Assim o caldo enzimático obtido nesta pesquisa terá maior percentual de enzimas consideradas verdadeiras com 33 kDa, pI ácido sendo classificada como da família 10. Segundo tal classificação o caldo produzido neste trabalho seria classificado como da família 11 por apresentar massa molecular baixa e pI básico ou ácido.

Cacais *et al.* (2001) utiliza eletroforese no gel (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide) SPD-PAGE em (10%) de acrilamida por zimograma como método de identificação de múltiplas formas de atividade xilanolítica, proteínas (Celulase, β -xilanase e β - xilosidase). Uma forte determinação de peso molecular identificado de 24 kDa entre 46 e 118 h de incubação na fermentação submersa de *Trichoderma harzianum strain 4* tendo

como substrato a xilana “oat spelt”, com pico de produção entre 10 e 34 h. β - xilosidase teve atividade expressa em 52 h de cultivo em toda análise. Mostra que classifica-se a xilana dependendo do seu grau de polimerização como *softwood xylans* de 70 a 130 kDa e *hardwood xylans* com grau de polimerização entre 150 e 200 kDa. Considerando o O-acetil- 4- O-metilglucuronoxilana como *hardwood* e arabino-4-O-metilglucuronoxilana como *softwood* e principais hemiceluloses. Informa que variedades de xilanas podem ser isoladas em água ou frações insolúveis por quebra de xilo-oligosacarídeos. Neste trabalho a classificação sugerida classificaria o caldo produzido por Bakker (2017) como *softwood xylans* por apresentar massas moleculares entre 14,4 e 30 KDa

4.8 - Avaliação de comportamento reológico da farinha pela análise do *falling number* e alveografia

A Tabela 4.9 ilustra os resultados comparativos da especificação da farinha para cada categoria de produto visando reconhecer se ocorreu alteração nas características da farinha devido à ação da xilanase na amostra. Pode-se observar na Tabela 4.9 que apresenta o resultado de *falling number*, alveografia e trabalho produzido pela massa, que após a adição da enzima a farinha padrão modificou sua classificação de farinha tipificada para macarrão (massas) à farinha mais adequada para panificação. O que decorre do enfraquecimento da rede de glúten ocasionado pela ação da enzima. O glúten é o conjunto de proteínas naturais do trigo insolúveis em água formada pelo trabalho mecânico e água durante a fabricação das massas. A formação da rede de glúten é explicada quimicamente pela interação de duas proteínas naturais do trigo, gliadina (ligação SHHS) e glutenina (ligações S-S) que fornecem ao produto as propriedades de extensibilidade e elasticidade respectivamente. Partes destas propriedades são alteradas naturalmente pelo processo de maturação da farinha quando quimicamente ocorre a oxidação das ligações S-H formando moléculas de água, disponibilizando mais açúcares simples para fermentação e alterando sua extensibilidade. Neste caso a alteração da rede de glúten seria explicada também pela liberação de maior quantidade de açúcares simples mas a causa foi a quebra da xilana presente na farinha após adição da enzima.

Tabela 4.9 – Resultados do número de queda (*Falling Number* - FN), da alveografia e do trabalho da farinha padrão e da farinha adicionada de xilanases produzida por *A. oryzae* com valores comparativos da classificação de farinhas na área de alimentos.

Item	Farinha padrão	Farinha c/enzima 1,0 e 2,0 mL	Massa	Pão	Bolo	Biscoito fermentado	Biscoito doce
FN(s)	488	403 e 356	>350	275-350	225-250	225-275	200-250
Razão P/L	4,15	1,34	>1,5	0,6-1,5	-	0,5-0,9	0,2-0,5
W(10 ⁻⁴ J)	208	247	>280	180-275	<100	150-200	<100

Referência: Instituto de Ciência e Tecnologia de alimentos- ICTA/ UFRGS (2014)

Neste ensaio do FN é medida a liquefação do amido gelificado de uma suspensão de farinha aquecida em banho fervente, similar ao que ocorre no forneamento de um pão. Logo, o FN retrata o potencial da farinha através da correlação entre viscosidade do amido gelatinizado e a atividade da enzima. Estabelece-se por esta análise as proporções em que se deve misturar duas farinhas ou doses de enzimas a serem adicionadas para tornar a farinha aceitável em diferentes categorias de produtos de panificação à serem fabricados.

Na interpretação dos resultados, ao se utilizar o método da alveografia, estima-se que o trabalho de deformação necessário à criação de uma bolha seja considerado como modelo similar ao que se passa na panificação quando da criação dos alvéolos de massa, sob a ação do gás carbônico liberado durante a fermentação do pão. Farinhas caracterizadas como pouco extensíveis são adequadas para massas, farinhas de média extensibilidade apropriadas para pães e muito extensíveis ideais para fabricação de biscoitos e bolos. Os aditivos enzimáticos comerciais adicionados tem o propósito de alterar esta extensibilidade e ou tenacidade para adequação das farinhas à categoria de uso na panificação ou biscoitos.

O ensaio da alveografia foi realizado adicionando-se 71,5 mL da enzima obtida a 250,0 g de farinha de trigo. Observando-se os valores dos resultados da Tabela 4.9 reconhece-se que ao diminuir a razão P/L da farinha com adição da enzima, ou seja, razão tenacidade/extensibilidade, de 4,15 para 1,34, pode-se reclassificá-la de farinha própria para massas para adequada à panificação. Fato que conjuntamente com resultado do número de

queda e trabalho confirma que com adição das xilanases tem-se a oportunidade de corrigir ou adequar os valores de *falling number* e alveografia apresentado pela farinha para adequação ao uso na área de panificação. Relacionado ao trabalho aumentou-se o trabalho exigido de 208 para 247 (10^{-4} J), indicando que a adição da enzima tornou a massa mais resistente ao manuseio. Logo, através destas determinações pode-se estabelecer as proporções em que se deve misturar duas farinhas ou doses de enzimas à serem adicionadas para tornar a farinha aceitável em diferentes categorias de produtos alimentícios industrializados. Tal fato torna-se importante no momento que em alguns continentes temos a dificuldade de produção de determinada classificação de farinha de trigo devido ao gênero do grão produzido por questões de condições climáticas e adaptações genéticas.

A Figura 4.7 apresenta o resultado de cartas alveográficas de três tipos de farinhas divulgados pelo (ICTA, 2014) para efeito comparativo. A primeira curva é a representação gráfica das características de uma farinha denominada normal tipificada para panificação (Mediana tenacidade - P e mediana extensibilidade - L); em segundo uma farinha para massas pouco extensível e de alta tenacidade, utilizada para fabricação de macarrão e, em terceiro, uma carta de uma massa excessivamente extensível tipificada para biscoitos e bolos. A tenacidade e extensibilidade das farinhas estão relacionadas com a quantidade e qualidade de proteínas presentes na amostra relativa a matéria-prima o trigo. Trata-se de proteínas insolúveis em água: a gliadina, que reproduz na massa a característica de extensibilidade e a glutenina que representa a tenacidade. Ao serem hidratadas e por ação de força mecânica do amassamento formam uma rede protéica denominada glúten, capaz de reter os gases da fermentação e manter o formato dos produtos após industrialização. Tal característica retém os grãos de amido, permitindo a formação do volume do pão na panificação e garantindo o formato das massas em macarrões. A enzima xilanase age na farinha diminuindo a rigidez da rede protéica, aumentando a maquinabilidade da massa, absorção de água nos pães e salto de forno.

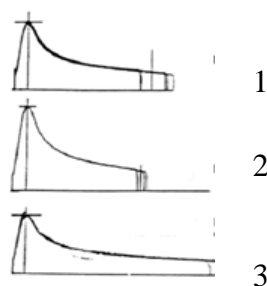


Figura 4.7 - Cartas alveográficas de três tipificações de farinhas para a área de alimentos. 1. Massa normal para panificação; 2. Massa pouco extensível para fabricação de macarrão e 3. Massa excessivamente extensível para biscoitos e bolos. Fonte: ICTA (2014).

A Figura 4.8 ilustra o padrão alveográfico da farinha padrão do ensaio em comparação com a carta alveográfica da farinha ao qual foi adicionado o caldo enzimático obtido no presente trabalho. Pode-se observar a mudança de tipificação da farinha pela atenuação do pico da curva e alteração em seu decaimento, tornando viável a utilização do caldo enzimático como aditivo alimentar na área de alimentos.

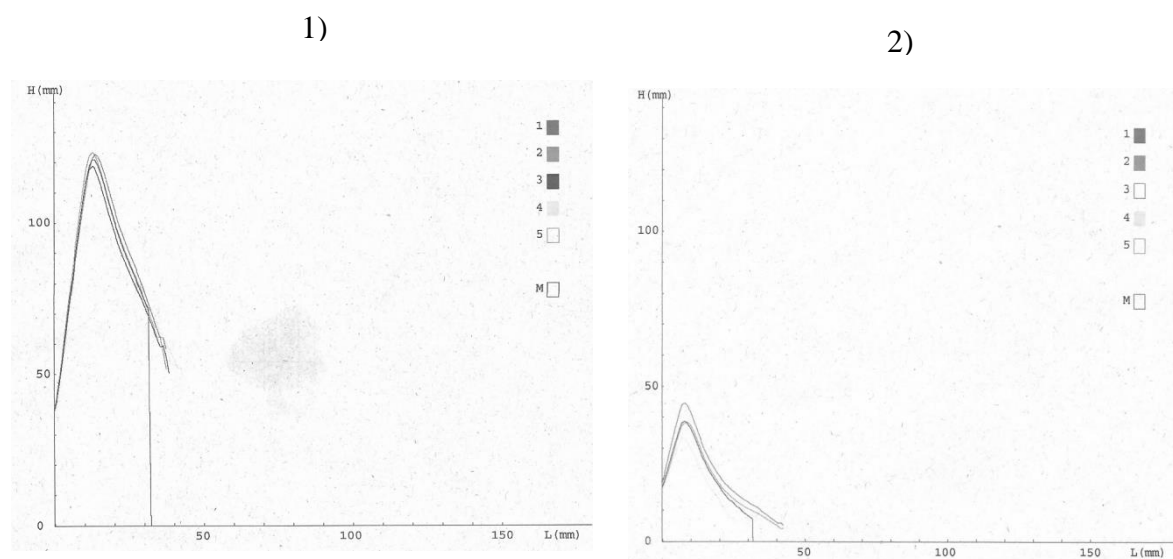


Figura 4.8 - Cartas alveográficas: 1) farinha padrão e 2) farinha adicionada do caldo enzimático obtido por *A. oryzae*.

Passarinho (2014) relata a avaliação da eficiência para hidrólise da farinha de trigo integral a 27 °C e clarificação de sucos por xilanases derivadas do gene (XynA) de *Orpinomyces* PC-2, como não sendo eficiente. Descreve a utilização de complexo enzimático que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal mas as ramificações do complexo xilanotítico. Este fato sob o ponto de vista industrial também é relatado como dificuldade para utilização direta das enzimas extracelulares produzidas por fungos. O que não é o caso desta

pesquisa, pois na utilização do complexo enzimático já ocorreu o resultado esperado de reclassificação da farinha, portanto não sendo necessária a purificação. Concorda que os fungos produzem enzimas mais ativas em pH baixo acrescidas das vantagens de eficiência de converção, ausência de perda de substrato por condições corrosivas, uso de reagentes não tóxicos e biodegradáveis. Testa a liberação de xilose na hidrólise da farinha de trigo não obtendo bons resultados com enzimas quiméricas produzidas na fermentação da cana de açúcar por *Orpinomyces* PC-2 a 50 °C. Mas comenta que as arabinoxilanas são de importância na panificação, pois produzem produtos viscosos com água que afetam a consistência das massas, a retenção de gás da fermentação no glúten e no amido e a textura final dos produtos forneados.

Continuando na aplicação na panificação são descritas por vários pesquisadores que as endoxilanas são aplicadas na preparação de pães e tornam a massa mais macia, aumentando o volume do pão, melhorando propriedades reológicas da massa durante a panificação, facilitando seu processamento diminuindo a retenção do gás e retardando a retrogradação do amido. Informou que as xilanases tem sido utilizadas largamente na panificação para melhorar a maquinabilidade e estabilidade da massa, estrutura do miolo e vida útil do pão. Avaliando o efeito de xilanases nos atributos de qualidade do pão considerou que a suplementação com xilanases proporciona melhorias nos atributos sensoriais do pão. Especificamente também relata tais melhorias e descreve proporcionar decréscimo na absorção de água de (8%), aumento da massas de (36,8%), melhoria no volume específico de (34,9%), melhor sabor, gosto, maciez e aceitação global.

Capítulo 5

Conclusões

5. Conclusões

Para suprir a deficiência de qualificação de mão de obra como obstáculo a inovação, a interlocução setor privado e academia demonstrou neste trabalho, ser uma alternativa viável e próspera de resultados.

Com relação à caracterização de resíduos da produção de margarina, concluiu-se que os resíduos não foram substratos viáveis para o crescimento dos microrganismos examinados nas condições testadas.

Na caracterização físico-química o farelo de trigo apresentou características adequadas como suporte e substrato para o crescimento de microrganismos. Apresentando cerca de 40% de hemicelulose, sugerindo potencial para indução na produção de xilanases. Sendo o microrganismo *Aspergillus oryzae* a microbiota de crescimento mais exuberante no farelo de trigo, apresentando o melhor desempenho com o farelo sem pré-tatamento;

Na caracterização biológica do farelo de trigo foram encontrados microrganismos que não apresentaram bons resultados nos ensaios para produção de xilanase;

Na seleção microbiana o microrganismo que apresentou melhor resultado foi a cepa de *A. oryzae* CCT nº 0975 (ATCC9362) quando adotado como substrato farelo de trigo NLNA, com 1 mL de inóculo, granulometria de 900 µm, pH 6,0, temperatura de 32° C e umidade de 13,6%. Obtendo proteína total extraída no caldo média de 3,87 ± 0,01 mg/mL e atividade enzimática média de 3,24 UI/g ± 0,01.

Os resultados do DCCR adotado para otimizar a produção de xilanases usando farelo de trigo como substrato e *A. oryzae* CCT nº 0975 (ATCC9362) em fermentação em estado sólido, indicaram que todos os parâmetros estudados: pH, umidade e granulometria, foram considerados significativos com 95% de confiança. O pH do cultivo foi o parâmetro que mais influenciou a atividade da enzima e sua redução favoreceu o processo. A atividade enzimática máxima da xilanase de 11,78 UI/g foi obtida em condição otimizada com pH 3,3, granulometria de 900,0 µm e umidade de 40%;

Na avaliação da estratégia de extração da enzima concluiu-se que a melhor condição de extração ocorreu quando foi utilizado o tampão Acetato de sódio, 100 mM e pH 5;

Na identificação por eletroforese, o caldo enzimático apresentou ponto isoelétrico-PI entre pH de 5,5 e 6,5 com atividade xilanásica provável entre 14,4 e 30 kDa.

Na avaliação da vida de prateleira o caldo produzido apresentou-se estável por 30 dias, mantendo aproximadamente (50%) da atividade da xilanase inicial após 3 meses de armazenagem e permanecendo estável por até 6 meses. Em relação a estabilidade a elevadas temperaturas observou-se que o caldo enzimático foi desnaturado a partir de 60 °C;

Nos testes de avaliação da aplicação, o extrato enzimático adicionado a farinha padrão realizou alterações de parâmetros reológicos da farinha *falling number* e alveografia ao ponto de reclassificá-la na tipificação da área de alimentos de farinha para massas para farinha adequada a panificação, portanto sendo viável comercialmente.

Com avaliação de resíduos industriais conseguiu-se testar e comprovar o farelo de trigo como potencial matéria prima na forma de substrato para induzir a produção de enzimas por FES pelo microrganismo *Aspergillus oryzae*. Um produto de origem biotecnológica aplicável na panificação com possibilidade de ser inserido na estratégia de inclusão de novos produtos de inovação em empresas de moagem de trigo.

Para estudos futuros recomenda-se a pesquisa de estratégias de suplementação do meio com fontes de aminoácidos, fósforo e minerais, otimização de estratégias de purificação da enzima, investigação de inibidores formados durante o processo de fermentação, pesquisa de fatores de escalonamento do processo para obter tecnologia reprodutível industrialmente, ensaios de liofilização e estudo de conservantes enzimáticos.

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

ABIMA, Associação Brasileira de Massas Alimentícias. História, aspectos nutricionais, tipos e formatos de margarinas. Disponível em: <<http://www.abima.com.br>>. Acesso em: 30 de março de 2012.

Análise editorial. Análise gestão ambiental 2010. Disponível em: <http://www.analise.com/site/publicacoes/exibe/3/analise-gestao-ambiental>. Acesso em: 28/12/2014.

Ahamed A, Vermette P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Engineer. J.* 2008; 42: 41-46.

ANDRADE, A. Biocombustíveis. *Revista Química e derivados*. Edição nº483 – Março de 2009. Disponível em: <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd483/bio/bio03.html>. Acesso em: 16/05/2011.

ANDRADE, C. *Production and characterization of extremely thermostable xylanolytic and amylolytic enzymes from the hyperthermophilic archaeon Pyrodictium abyssi*. 1996. 113f Ph.D. Thesis. Technical University Hamburg-Harburg. Hamburg, Germany.

ANDRADE, C.C.P.; COSTA, F.A.A. e MAUGERI-FILHO, F. Produção e purificação de xilanase termoestável de *Cryptococcus flavescens* isolado da mata atlântica. XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2012, Búzios, RJ.

ANDRADE, Carolina M.M.C.; PEREIRA JR., Nei e ANTRANIKIAN, Garo. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hidrolytic enzymes. *Rev. Microbiol.* vol.30, n.4, p. 287-298 [online]. ISSN 0001-3714. 1999.

AQUINO, V. Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos. Dissertação de (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 80p.

ARANDA, D. A., & ANTUNES, O. A. *Patente Nº PI0500333-4*, 2005.

ARDUENGO, P.M. 2010. Sloppy technicians and progresso f Science. Promega Connections. Available from:<http://promega.wordpress.com/2010/03/15sloppy-technicians>. Access on: 02/05/2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 10004. Resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, ABNT, 2004.

AZARIAS, G.S.; CUNHA, F.M.; ESPIRITO SANTO, M.C.; BADINO, A.C. e FARINAS, C.S. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de celulasas e xilanasas por *Aspergillus niger* pelo processo de fermentação combinada. XIX COBEQ 2012, Embrapa Instrumentação Laboratório de Agroenergia, UFSC. Búzios, RJ. ISSN2178-3659.

BACHA, Carolina Barbosa. Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de "Cornell Net Carbohydrate and Protein System" [online]. Pirassununga : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006. Dissertação de Mestrado em Nutrição Animal. [acesso 2012-05-10]. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-12012007-163126/>>.

BARROS M.; FLEURI L. F. and MACEDO G.A. *Seed lipases: sources, applications and properties – a review*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 27, n. 01, p. 15 - 29, 2010.

BARROS NETO, B. de. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 3ª edição, Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007, p.480.

BARRIOS- GONZÁLES J. and MEIJA A. Production of secondary metabolites by solid state fermentation. *Biotechnology. Annual Review* 2:85-121. 1996.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 66, 101-107, 1998.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* v.3, p.286-290, 1985.

BRIJWANI K., RIGDON A., and VADLANI P.V. *Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing*, Enzyme Research, vol. 2010, Article ID 149748, 10 pages, 2010. doi:10.4061/2010/149748.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 42 p. 98, 2007.

CABALLERO, N.E.D. *Xilanase de Aspergillus SP 2M1: produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas Kraft*. 2006.1995.158f. Dissertação (mestrado) da Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, São Paulo.

CACAIS, André O.Guerreiro; SILVEIRA, Fabiane Q. de Paula and FERREIRA FILHO, Edivaldo Ximenes. Production of xylan-degrading enzymes by a *Trichoderma harzianum* strain. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2001, v.32, n.2, p.141-143. ISSN 1517-8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000200014>.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; MAIA, M. M. D. ; BORBAL, F. F. S. ;MELO, K. G. SANTOS, C. M. S. O.; REIS, E. R. A.; MORAIS JR., M. A. and LIMA-FILHO, J. L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. *J. of Microbiology & Biotechnol.* v.19, p.17-20, 2003.

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

CANILHA, L.; CARVALHO, W. E SILVA, J.B. Caracterização do hidrolisado de palha de trigo visando extração da xilose para bioconversão em xilitol. VII ENCONTRO LATINO

AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Faculdade de eng. química de Lorena, Departamento de biotecnologia. São Paulo. 2002. p.1221-1224.

CARDOSO, A. L. *Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Bronsted para produção de biodiesel*. 2008. *Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa*. Viçosa, MG.

CERTREM, *Tecnologia de massas*. Centro Regional de Treinamento em Moagem e Panificação. Fortaleza-CE, 2004. v.1,p.34.

CHANITNUN, KANKIYA and PINPHANICHAKARN, P..Glucose(xylose) isomerase production by *Streptomyces sp.* CH7 grown on agricultural residues. *Braz. J. Microbiol.* 2012, vol.43, n.3, p. 1084-1093. ISSN 1517-8382. Available from <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300035>>. Access on 11 July 2014.

CGEE – Central Intelligence Agency. World Factbook {4 July 2010} ISSN -1553-8133.

CHERUBINI F. The biorefinery concept using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy conversion and management*, v.51, p.1412-1421, 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Avaliação da safra agrícola cafeeira 2007/2008. *Ministério da Agricultura*. Brasil, 2008.

CERTREM, *Tecnologia de massas*. Centro Regional de Treinamento em Moagem e Panificação. Fortaleza-CE, 2004. v.1,p.34.

COLLA, Luciane Maria, FICANHA, Aline M. M., RIZZARD, Juliana, BERTOLIN, Telma Elita, REINEHR, Christian Oliveira, and COSTA, Jorge Alberto Vieira. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 725959, 9 pages, 2015. doi:10.1155/2015/725959.

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

COULTATE, T.P. *Alimentos: a química de seus componentes*. 3º edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.

CORREA, R.G.L. e FERREIRA, O.M. *Resíduos industriais – métodos de tratamento e análises de custos*. Dissertação (Mestrado em Eng. ambiental) – Universidade Católica de Goiás, departamento de engenharia Ambiental. Goiânia/ Goiás, 2007.

COURI, S. *Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus Níger mutante 3T5B8*. 2000.1993.198f. Tese de doutorado em Ciências. Pós graduação em tecnologia de processos bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CUNHA, Luana Lima. *Purificação e caracterização bioquímica e biofísica de uma xilanase do Aspergillus foetidus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R.F.H. *From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research*. Biotechnology Advances, vol. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.

DEKKER, M. *Handbook of Fungal Biotechnology*. Dilip K. Arora ed., 2003, New York, 600p.

DELABONA, Priscila da Silva. *Produção de glicosil hidrolases por Trichoderma harzianum para o processo de sacarificação da biomassa vegetal*. Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, 2015. 149 f.

DE VRIES, R., VISSER, J. *Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Microbiology and Molecular Biology. 1092-2172, 2001

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H.; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis – science and industrial application*. Critical Reviews in Biotechnology, Boca Raton, v. 13, n. 1, p. 57-98, 1993.

DORADO, M.P.; LIN, S.K.C.; KOUTINAS, A.; DU, C.; WANG, R. and WEBB, C. *Cereal-based biorefinery development: utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid*. *Journal of Biotechnology*, v.143, p. 51-59, 2009.

DURAND, A.; DE LA BROISE, D. e BLACHERE, H. *Laboratory scale bioreactor for solid state processes*. *Journal of Biotechnology*, v.8, p.59-66, 1988.

DUTRA, Thiago Rodrigues. *Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e hemicelulasas em Chrysosporthe cubensis cultivado em meio líquido*. Dissertação para obtenção do grau de mestre, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013.

ESTERBAUER, H. W. Steiner, I. Labudova, A.Heermann., and M. Hayn. *Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale*. Bioresource Technology, v. 36, p. 51 - 65, 1991.

FABER, K. *Biotransformations in organic chemistry: textbook*. Berlim: Ed. Springer-Verlag, 2000. 453 p.

FALKOSKI, D. L., GUIMARÃES, V. M., DE ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes*. Original Research Article, 2013.

FARINAS, C. S. *Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of Aspergillus niger*. Braz. J. Chem. Eng. São Paulo, v. 28, n. 1, mar. 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01046.322011000100003&lng=pt&nrm=iso>. Acessos m 25 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322011000100003>.

FERNANDES, Natália Henrique. *Produção de xilanase e xilosidase por Aspergillus versicolor*. Monografia Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP. Araraquara, 2012.

FERNÁNDEZ, Daniel Ernesto Rodríguez. *Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial*. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FRANCO, T.T. *Extração em duas fases aquosas de xilanase alcalina produzida por Bacillus pumilus e aplicação no branqueamento de polp de Kraft*. 1999. Dissertação de mestrado da Faculdade de engenharia química FEQ. UNICAMP. Campinas, SP.

FELIX, A. S. *Avaliação do tempo de trânsito orocecal e da absorção de lactose e D-xilose em pacientes chagásicos*. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Medicina. Goiás, 206f. 2014.

FREGOLENTE, P.B.L., PINTO, G. M.F., WOLF-MACIEL, M. R., FILHO, R. M. e BATISTELLA, C. B. Produção de monacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 13081-970 Campinas - SP, Brasil. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p.1539-1543, 2009.

FREIRE, G. D. M. and CASTILHO, F. L. Lipases em Biocatálise. In: Bon et al. (org). *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro, Interciência, 2008.

GANDRA, K.M.; DEL BIANCHI M.; GODOY V. P., QUEIROZ F.P.C. e STEEL C.J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. Application of lipase and monoglyceride in fiber enriched pan bread. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.28, p.182-192, jan.-mar. 2008. 192p.

GARZA, J.C.; WOODRUFF, D.S. Determination of subspecific identity of concolor gibbons (*Hylobates concolor*) from non-invasively obtained DNA. *Zoo Biology*, v. 13, p. 383-387, 1996.

GHILDYAL, N.P.; GOWTHAMAN, MK.; KARANTH,N.G. and RAO, K.S.M.S.R. interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors:effect of temperature gradients. *Enzyme and microbial technology*, v. 16,p. 253-7, 1994.

GHOSE, T.S. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.*, v.59, p.257-268,1986.

GOYAL, M.L. . Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 39, n. 3, Sept. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517.83822008000300025&lng=en&nrm=iso>. access on 11 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000300025>.

GOMES, Eleni; GUEZ, Marcelo Andrés Umsza; SILVA, Natalia Martin e Roberto da. *Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial*. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, R. Cristóvão Colombo, *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto – SP, Brasil *álcool ao etanol trajetória única*. Edição bilíngüe. Ed. terceiro nome, 2007.

GOUJARD, L.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; LECOMTE, J.; PINA, M.; CLAUDE, S.; LE PETIT, J. e FERRÉ, E. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Analytical Biochemistry*. v.385, 161-167, 2009.

GRAFZIOLA, F., SOLIS, V. S., & CURI, R. *Estrutura química e classificação dos ácidos graxos*. In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos ,2002. p. 7-23.

GRIEBELER N, POLLONI A.E., REMONATTO D., ARBTER F., VARDANEGA R., CECHET J.L. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food Bioprocess Technol* 2011;4(4):578-86

GUEDES, R. C.; ROCHA, C. E. M. ; CRUZ, P. P.; Silva, N.M.P. ; SANTOS, E.S. ; Macedo, G.R. . Estudo de pré-tratamentos de resíduos lignocelulósicos na indução à síntese de enzimas celulases. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Curitiba.

GUPTA R., K. A., SYAL P., SINGH Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res*. 2015 Jan;57:40-54. doi: 10.1016/j.plipres.2014.12.001. Epub 2015 Jan 6.

HE, L.; Bickerstaff, G.F.; Paterson, A.; Buswell, J.A. Evaluation of catalytic activity and synergism between two xylanase isoenzymes in enzymic hydrolysis of two separate xylans in different states of solubility. *Enzyme Microb. Technol.*, v.16, p.696-702, 1994.

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

IAL, Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos-químicos para análise de alimentos. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*.14. ed. Brasília: Ed. MS, 2005.

ICTA. Instituto de Ciência e tecnologia Industrial da farinha de trigo. Disponível em:<http://www.ufrgs.br/napead/repositorio/objetos/avaliacao-farinha-trigo/creditos.php>. acessos em 25 set. 2014.

ISIL, S.; NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Braz. arch. biol. technol.*, Curitiba , v. 48, n. 2, mar. 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516.89132005000200004&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 25 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000200004>.

JAEGER, K. and EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.13, 390-397, 2002.

JAEKEL, L.eandra Z. Influence of xylanase addition on the characteristics of loaf bread prepared with white flour or whole grain wheat flour. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas , v. 32, n. 4, dez. 2012 . Disponível em

- <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612012000400030&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 25 set. 2014. Epub 02-Nov-2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000116>.
- JALEEL, S.A.; SRIKANTA, S. and KARANTH, N.G. Production of fungal amyloglucosidase by solid state fermentation influence of some parameters. *Journal of microbial Biotechnology*, v.7,n.2, p. 1-8, 1992.
- JING, F., An X. and Shen, W. The characteristics of Hydrolysis of Triolein Catalyzed by Wheat Germ Lipase in Water-in-oil Microemulsions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, n. 3, p.24-25, 2003.
- JOSHI, CHETNA and KHARE, Kumar S. Induction of xylanase in thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum* and *Sporotrichum thermophile*. *Braz. arch. biol. technol.* [online]. 2012, vol.55, n.1, pp. 21-27. ISSN 1516-8913. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000100003>.
- KAMAT T, Rodrigues C, Naik CG. Marine-derived fungi as a source of proteases. *Indian Journal of Marine Sciences*. 2008; 37(3):326-328.
- KAMM B. and KAMM M. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol biotechnol*, v. 64, p. 137 – 145, 2004.
- KAR, Sanjay et al. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2006, vol.37, n.4, pp. 462-464. ISSN 1517-8382.
- KULKARNI, M.G.; SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Stimulation of rice (*Oryza sativa* L.) seedling vigour by smoke-water and butenolide. *Journal of Agronomy and Crop Science, Berlin*, v. 192, n. 5, p. 395-398, 2006.
- CERTREM, *Tecnologia de massas*. Centro Regional de Treinamento em Moagem e Panificação. Fortaleza-CE, 2004. v.1,p.34.
- KUHAD, R. C. SINGH, A. Lignocellulose biotechninology: current and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*, Boca Raton, v.13, n.2, p.151-172, 1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p.680-685, 1970.
- LAMEIRA, S. A. *Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de Bacillus sp.* Tese (doutorado em produção vegetal) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, campos dos goytacazes-RJ. 123p. 2013,
- LEAL, R. de S. Síntese e caracterização de produtos naturais. Natal-RN:EDUFRN, 2010. P.232.
- LEÃO, L. S. *Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióbico*. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química – EQ.

LEMOS and SOLÓRZANO J.L. . Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 31, n. 3, set. 2000 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517.83822000000300010&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 25 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300010>.

LEMOS, J. L. S. *Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar*. Tese de doutorado de bioquímica pela UFRJ, CETEM / MCT, 2006. ISSN 0103-7374 STA-35 ISBN 85-7227-234-8.

LEWIS, M. J. *Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado*. Zaragoza: Acribia, 1993. 494 p.

LIAQUAT, M. and Apenten, R. K. O. Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters Using Plant 28 M. Barros, L. F. Fleuri and G. A. Macedo Brazilian Journal of Chemical Engineering Seedling Lipases in Organic Media. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, v.65, n.2, p.295, 2000.

LOPES, V. R. de O.; FAHEINA JÚNIOR, G. da S.; BRAGA, R. M.; JESUS, M. A. de; MARTINS, C. M.; PINTO, G. A. S. Atividade de xilanase em cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17. 2009, Natal. Anais. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

LOPES, Fernanda Pereira. *Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre*. Dissertação (mestrado) em Engenharia de Alimentos. 2010. Universidade estadual de Campinas, São Paulo.

MACEDO, Isaias C.. Situação atual e perspectivas do etanol. *Estud. av.* [online]. 2007, v.21, n.59, p. 157-165, 2007. ISSN 0103-4014.

MACIEL, G. M. *Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação n estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. 2006. Dissertação de mestrado na área de processos biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAIA, M. M. D., HEASLEY, A., CAMARGO-DE-MORAIS, M. M., MELO, E. H., MORAIS, M. A. JR., LEDINGHAM, W. M. & LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v.76, p. 23-27, 2001.

MARTON J.M., FELIPE M.G.A., ALMEIDA E SILVA J.B., PESSOA JÚNIOR A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. *Braz J Chem Eng.* 2006; 23 (01): 9-21.

MASE, T.; MATSUMIYA, E. and MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.59, p.329-330, 1995.

MILANEZI, N.V.G. *Purificação e caracterização de endo-1,4-β- xilanase produzida por Aspergillus niger com características de interesse industrial*. 2010. Dissertação de mestrado

do Programa de pós-graduação em biologia molecular. Universidade Federal de Brasília, Distrito federal.

MILLER, G.L., Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar., *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, pp 426-428.

MELO, M. *Bioprospecção de fungos decompositores de celulose e lignina no Cerrado do Sul do Brasil*. 2014. Dissertação de mestrado do Centro de Ciências e tecnologias para a sustentabilidade. Programa de pós-graduação em biotecnologia e monitoramento ambiental. Universidade Federal Campus, Sorocaba.

MORETTO, E., & FETT, R. **Tecnologia de óleos de gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo, Varela, 1998, v.150.

MORETTI, Marcia M. S. et al . Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 43, n. 3, set. 2012 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517.83822012000300032&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 25 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300032>.

MUDGETT, R.E. Microwave properties and heating characteristics of foods technology. 40(6). 84-93. 1986.

MUSA H., ADEBAYO-TAYO B.C. Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production. *AUJT* 2012;15(3):179-86.

NARASIMHAN V. and VALENTIN BHIMBA B. Screening of extracellular lipase releasing microorganisms isolated from sunflower vegetable oil contaminated soil for bio-diesel. *Asian J Pharm Clin Res*, vol 8, issue 2, 2015, 427-430

NWUCHE, N.C.O. and OGBONNA, J.C. Isolation of Lipase Producing Fungi from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites at Nsukka. ISSN 1516-8913 Printed in Brazil, *Brazilian archives of biology and technology an international journal*. Department of Microbiology; University of Nigeria; Nsukka; Enugu State – Nigeria. Vol.54, n. 1: pp. 113-116, January-February 2011.

ODA, k.; KAKIZONO, D. YAMADA, O.; IEFUJI H.; AKITA, O.; IWASHITA K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, may 2006, p.3448-3857, 2006.

OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; NETO, P. O. LIMA, V.M.G. *Production and characterization of lipase produced by Fusarium sp. and its application in production of biodiesel*. Faculdade de Ciências e Letras, Ciências Biológicas, Rio Claro, 2008.

OLIVEIRA, B. H.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. *Seleção de microrganismos isolados da Mata Atlântica produtores de lipase tolerante a solventes e extremos de pH*. IV Simpósio em Microbiologia Aplicada, 19 a 21 de abril de 2009, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro.

ORLANDO FILHO, J. *Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76, em função da idade, em três solos do estado de São Paulo*. Piracicaba: Planalsucar, boletim técnico 1. 1980. 127p.

PADILHA, G.S.; CURVELO-SANTANA, J.; ALEGRE, R.M. and TAMBOURGI, E.B. Expanded bed adsorption of an alkaline lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of chromatography B*, n.877, p. 521- 526, 2009.

PALMA, M.B. *Produção de xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido*. 2003. 169f. Tese (Doutorado em engenharia química), Centro tecnológico, Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PAQUES, F. W. and MACEDO, G. A., Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review. *Química Nova*, v.29, n. 1, p.93, 2006.

PANDEY, S.B.A. Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, Council of Scientific & Industrial Research, Trivandrum - 695 019, India. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Paraná Institute of Technology Publication.v.43, n.5, p. 453-460, 2000.

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

PANDEY, A. Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresource technology*,v.37, p. 169-72, 1991.

PAGNUSSATT, F. A., GARDA-BUFFONI, J., GUTKOSKI, L. C. e BADIÁLE-FURLONGI, E. Propriedade das frações proteicas de cultivares de arroz, aveia e trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 70, n. 2, jun. 2011 . Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552011000200013&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 07 mar. 2016.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Revista ciência e tecnologia de alimentos*, Campinas SP, v.23(2), p.135-140, maio-ago,2003.

PASSARINHO, A. T. P. *Produção e caracterização de xilanases derivadas do GENE XynA de Orpinomyces PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise da farinha e clarificação de sucos*. Dissertação de mestrado no núcleo de pesquisas em ciências biológicas. Programa de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. 2014.

PEIXOTO, G.L.; MARTINS, S.V.; SILVA, A.F. & Silva, E. Estrutura do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na Área de Proteção Ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19(3): 539-547. Pickett, S.T. & White, P.S. 2005.

PEREIRA, Douglas Endrigo Perez. *Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado .Goiânia*. 2013 Dissertação de (mestrado) no Programa de Pós-

Graduação, em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal de Goiás- Instituto de Ciências biológicas, Goiânia, 2013.

PESSOA JR., A. e KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2005.p.444.

PITARELO, A. P. *Avaliação de susceptibilidade do bagaço e da palha de Cana de açúcar-bioconversão via tratamento a vapor e hidrólise enzimática*. 2007. 145f. Dissertação de (mestrado) na área de química. Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnický, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 355-361, 1999.

RAMOS-SANCHEZ L.B., CUJILEMA-QUITIO M.C., JULIAN-RICARDO M.C., CORDOVA J., FICKERS P. 2015. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *J Bioprocess Biotech* 5:203. doi: 10.4172/2155-9821.1000203

POLIZELI, M.L. Properties and commercial application of xylanases from fungi. *Mycotechnology: current trends and future prospects*, p. 82-108, 2009.

PORTAL DA AGROPALMA. (s.d.). Acesso em 2009, disponível em www.agropalma.com.br.

RIBEIRO, E.P. **Química de alimentos**. 2º edição, São Paulo:Blucher, 2007.p.184.

ROSA I. Z. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação (mestrado em microbiologia) programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Ibilce, da Universidade Estadual Paulista-Unesp. São José do Rio Preto. São Paulo. 62p. 2014

ROSE, D. J. and PIKE, O. A., A Simple Method to Measure Lipase Activity in Wheat and Wheat Bran as an Estimation of Storage Quality. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v.83, n. 5, p.415, 2006.

SALLA, D. A., FURLANETO, F.P.B., CABELLO.C., KANTHACK, R.A. D. Avaliação energética da produção de etanol utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2516-2520, 2009.

SANTOS, Fernando A. et al . Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500025&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>.

SALES, M.R.; MOURA, R. B.; PORTO T.S.; MACEDO, G.R.; PORTO A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296, nov. 2010.

SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia**; trad. Fátima Murad. - 3º Ed. Porto Alegre:Artmed, 2002.

SAMANTA, A.K et al . A simple and efficient diffusion technique for assay of endo β -1,4-xylanase activity. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 42, n. 4, Dec. 2011 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517.83822011000400016&lng=en&nrm=iso>. Access on 11 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400016>.

SANOGO, T.; PÂQUET, F.; AUBERT, G. et al. Purification of α S1-casein by fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.2242- 2246, 1989.

SÀNCHEZ, O. J. CARDONA, C.A. Producción biotecnológicas de alcohol carburante II: Integración de procesos. *Interciencia*, v. 30, p.679-686, 2009.

SANTIAGO, A. C. Construção e caracterização de uma enzima quimérica obtida pela fusão gênica endoglucanase-xilanase de *Trichoderma harrzianum*. 2013. Dissertação mestrado do Centro de Ciências biológicas e da Saúde. Programa de pós-graduação em genética evolutiva e biologia molecular. Universidade federal de São Carlos, São Paulo

SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R.; MARTIN, C.. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Quím. Nova* [online]. 2010, vol.33, n.4, p. 904-908. ISSN 0100-4042.

SANTOS, S.F.M. *Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato*. 2007. 130f. Tese (doutorado). Programa de pós graduação em engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

SATO, K.; NAGATANI, M. SATO, S. A method of supplying moisture to the médium in a solid-state, culture with forced aeration. *J. Ferment. Technol.*, v. 60, n.6, p.607-10, 1982.

SCHMID, A.; DORDICK,J.S.; HAER, B.; KIENER, A.WUBBOLTS, M.E., WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 109, p. 258-268, 2001.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. de A. e AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Blucher, 2001. p.541.

SCHUEER, P. M. DE FRANCISCO, A. MIRANDA, M.Z. LIMBERGER, V.M. Review trigo: características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011. 211 ISSN 1517-8595.

SEGS. História do milho e trigo. Disponível em: <[WWW.planetaeducação.com.br/composição e historia do trigo/milho](http://WWW.planetaeducação.com.br/composição_e_historia_do_trigo/milho)>. Consulta em: 11/05/2011.

SRINIVAS,M.R.S.; CHAND, N. and ALONSANE, B.K. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/ product promoters, minerals and enzyme inducers for production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS234 in solid state fermentation system. *Bioprocess engineering*, v. 10, p. 139-44, 1944.

SILVA, J. C.; SOLTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E. R.. Influência da composição do meio de cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulasas por actinomicetos, *XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 2008.

SILVA, S.S.; CARVALHO, R.R.; FONSECA, J.L.C.; GARCIA, R.B.. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. *Polímeros* [online]. 1998, vol.8, n.2, pp. 25-33. ISSN 0104-1428. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14281998000200005>>.

SILVA, C.H.C.; PULS, J.; SOUSA, M.V.; FERREIRA FILHO, E.X.. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Rev. Microbiol.* [online]. 1999, vol.30, n.2, pp. 114-119. ISSN 0001-3714. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37141999000200005>.

SILVA, R.N. MONTEIRO, V.N., ALCANFOR, J.D.X., ASSIS, E. M.; ASQUIERE, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciencia e tecnologia de alimentos*, Campinas, v.23, n.3, p.337-341, set-dez.2003.

SILVA, C. O. G.. *Emericella nidulans*. 2014. 111 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2014. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/15669-dc.description> Dissertação (mestrado)—Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2014.

SILVEIRA, F.Q.P.; MELO, I.S.; FILHO, E.X.F. Carbohydrate -hydrolysing enzyme activity production by solid-state cultures of *Trichoderma harzianum* strains. *Rev. Microbiol.*, n. 28, p.1-5, 1997.

SLUITER A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D: Determination of extractives in biomass. In *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2005.

SOUZA, A.L.; GARCIA, R; FILHO, S.C.V.; ROCHA, F.C., CAMPOS, J.M.S.; CABRAL, L. S. e GOBBI, K.F. Casca de café em dietas de vacas de lactação: consumo, digestibilidade e produção de leite. *R. Bras. Zootecnia*. v. 34. n.10. Viçosa, Nov/dez. 2005.

SOUZA, C.; ANDREOLI. Cana-de-açúcar: a melhor alternativa para conversão da energia solar e fóssil em etanol. *Economia e Energia*, Belo Horizonte, n.59, 4p, 2007. Disponível em: <http://ecen.com/eee59/eee59p/cana_melhor_conversorl.htm>. Acesso em: 08 dez. 2009.

SOUZA, E.L.L. e MACEDO, I.C. Etanol e bioeletricidade : a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética . São Paulo. Ed.Luc Projetos de Comunicação, 2010. P.314.

SOLOGUREN, L. *Brasil: o novo desafio para consolidar as exportações do milho*. São Paulo: Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 2007. 2p. Disponível em: < <http://www.nippo.com.br/campo/artigos/artigo430.php> >. Acesso em: 01 nov. 2009.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHER, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering journal*, v.13, p. 205-218, 2003.

SUTO, M., TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol. 92, No. 4, 305- 311, 2001.

TARABOULSI, F. A., Jr., & Vitolo, M. (2010). *Analytica*, 8(47), 86–93.

TERRONE, Carol Cabral. Xilanase *Penicillium chrysogenum*: Produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada). Rio Claro, 2013.

TURATTI, J. M., GOMES, R., & ATHIÉ, I. Lipídeos: aspectos fundamentais e novas tendências. 78, 2002.

TREICHEL H, Oliveira DD, Mazutti MA, Luccio MD, Oliveira JV. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol* 2010; 3:182-96.

UMSZA-GUEZ, Marcelo A. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2011, vol.42, n.4, pp. 1585-1597. ISSN 1517-8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400046>.

UNDERKOFER, L.A.; SEVERSON, G.M. and GOERING, K.J. Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, v. 38, p.980-85, 1947.

VIEIRA, A. P. *Síntese de ésteres monoaquílicos de ácido palmítico utilizando zeólita e lipase imobilizada*. 2005. 143f. Dissertação de (mestrado). Escola de Química -Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

WANG, Y. et al. Influence of green banana flour substitution for cassava starch on the nutrition color, texture and sensory quality in two types of snacks. *LWT-Food Science and Technology*, v.47, p.175-182, 2012. Disponível em: . Acesso em: 23 out. 2014. doi: 10.1016/j.lwt.2011.12.011.

WENZEL, B. M. et al . Aluminothermic reduction of Cr₂O₃ contained in the ash of thermally treated leather waste. *Braz. J. Chem. Eng.*, São Paulo , v. 30, n. 1, mar. 2013 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104.6322013000100016&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 25 set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322013000100016>.

WYNN, G.H.; SANDSON, N.B.; COZZA, K.L. *Psychosomatics. Academy of Psychosomatic Medicine*. n. 48, p.79-85, 1979.

YOON, L.W.; NGOH, G.C.; CHUA, A.S.M. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v.53, n. 4, p.250–256, 10 September 2013.

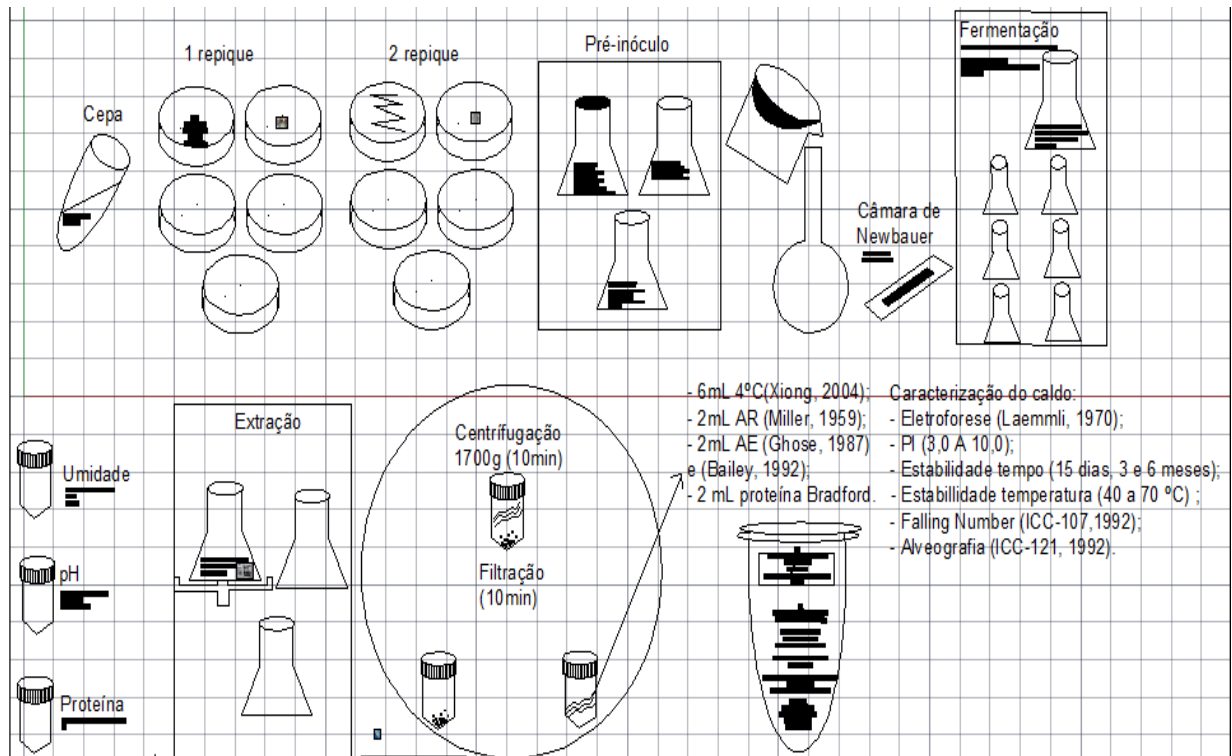
XIONG, H.; WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURENEN, O. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Process Biochemistry*, v.39, 729-733, 2004.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.; Lichtig, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 2, n.1, p. 6, 1998.

ZHANG, Z.; L.V., G.; PAN, H.; FAN L.; SOCOOL, C.R.; PANDEY A. production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn) by *Cordyceps militaris*. *Food technology and biotechnology*, n.50, p.32-39, 2012.

Anexos

7. ANEXO 1 – Fluxograma de pesquisa da produção de enzimas



ANEXO 2 Preparação de soluções:

Preparação Solução de xilana 1% (Xilana de bétula “xylan from birchwood”, Validade 10/06/2015, fabricante Sigma Aldrich código X -4252) – Dissolve-se 1g de xilana em 20ml de NaOH 1 M sob agitação, em temperatura ambiente (30°C), durante 30 minutos. Adiciona-se a amostra de xilana 20ml de HCl 1 M. O volume final (100ml) foi completado com solução de tampão acetato de sódio 100mM, PH 5,0 mantendo agitação por mais de 15 minutos. A solução foi submetida à centrifugação 12000rpm por 15 minutos a 7°C. O sobrenadante (xilana solúvel) foi utilizado para o ensaio enzimático.

Preparação do tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 – Deve-se preparar duas soluções estoque:

A: Solução de ácido acético 0,1M (Merck código 21606) (11,55g em 1000mL de água destilada).

B: solução acetato de sódio 0,1M (Vetec código 110) (16,4 g de $C_2H_3O_2Na$ ou 27,2g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ em 1000ml de água destilada).

Misturou-se 14,8ml da solução A com 35,2 mL da solução B e completa-se o volume com água até 100mL.

Reagente ácido dinitrosalicílico (DNS): Dissolve-se a frio 10g DNS (Vetec código 1025) em 500ml de água. Adiciona-se 200ml de NaOH 2N (Vetec código 101) (16g/200ml). Terminada a dissolução, acrescenta-se 300g do sal de Rochelle (Vetec código 128) (tartarato duplo de sódio e potássio). Perfazendo 1000mL (com água destilada) no balão volumétrico. A solução foi guardada em frasco escuro protegido da luz com papel alumínio e a padronização da solução feita 10 dias após a preparação da solução.

Reagente BRADFORD

Dissolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck Coomassie Brilliant Blue G250 for Electrophoresis 1.15444 – 0025; ou: Sigma Brilliant Blue G Bo770-25g; ou Vetec ou Biorad) em 50 mL de etanol 95% (VETEC, pa, Carlo Erba ou outro fornecedor), adicionando depois lentamente (por exemplo com ajuda de um funil de separação) 100 ml de ácido fosfórico concentrado (VETEC 1529 Ac. Fosfórico pa. ACS Isso 1L pa., Carlo Erba ou

outro fornecedor). Finalmente dilui-se a solução obtida em balão volumétrico até 1L com água destilada, agita-se periodicamente e deixa a solução de repouso por 24h e filtra-se a solução (a vácuo) por um filtro de papel para retirar corante não solubilizado, partículas e eventuais outras impurezas.

Este método emprega o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e baseia-se na interação de grupos ácidos e básicos de proteínas com grupos dissociados de componentes orgânicos, formando precipitados coloridos. Considerado método menos suscetível a interferentes, exceto para: SDS, Triton X-100, detergentes comerciais, tampões básicos, hidróxido de sódio e Tris >2. A mudança de coloração de marrom alaranjado para azul referênciada o deslocamento do equilíbrio da reação acarretado pela mudança do pH, revelando a presença da molécula da proteína que forma complexo com o corante. Devido aos interferentes citados em alguns casos recomenda-se a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (Zaia *et al.*, 1998).

Preparação da curva de calibração para a determinação de proteína:

Para a determinação da concentração de proteína em uma amostra líquida preparou-se uma curva de calibração utilizando a Albumina bovina Sérica (BSA) (Sigma-A3059) como proteína padrão. Pesou-se 1g de BSA com posterior diluição até 1L com água destilada, apenas sob agitação magnética. Prepararam-se 5 padrões de concentração conhecida e lidas as densidades óticas dos padrões preparados a 280 nm, contra um branco de água destilada. Construído o gráfico da absorvância em 280 nm (eixo y) contra a concentração de proteína nos padrões conhecidos, e estabelecida a reta de calibração, obtém-se a equação e o coeficiente de correlação para as cinco concentrações de BSA (0-1,4 g/L) e foram determinadas as concentrações de proteína. Observa-se se a região da curva de calibração absorvância / concentração usada para a quantificação segue a Lei de Lambert-Beer, ou seja, se é linear.

ANEXO 3 – Tabelas de análises referente a classificação os resíduos da produção de margarinas

Parâmetros avaliados para classificação de resíduos no ensaio de solubilização – NBR 10.006:2004.

Parâmetros	Unidade	Valor máximo permitido (VMP)
Alumínio	mg/L	0,2
Arsênio	mg/L	0,01
Bário	mg/L	0,7
Cádmio	mg/L	0,005
Chumbo	mg/L	0,01
Cianeto	mg/L	0,07
Cloreto	mg/L	250,0
Cobre	mg/L	2,0
Cromo total	mg/L	0,05
Fenóis totais	mg/L	0,01
Ferro	mg/L	0,3
Fluoreto	mg/L	1,50
Manganês	mg/L	0,1
Merúrio	mg/L	0,001
Nitrato (expresso em N)	mg/L	10,0
Prata	mg/L	0,05
Selênio	mg/L	0,01
Sódio	mg/L	200,0
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	mg/L	250,0
Surfactantes	mg/L	0,5
Zinco	mg/L	5,0

Parâmetros relacionados no ensaio de lixiviação – NBR 10.005:2004.

Parâmetros	Unidade	Valor máximo permitido (VMP)
Arsênio	mg/L	1,0
Bário	mg/L	70,0
Cádmio	mg/L	0,5
Chumbo	mg/L	1,0
Cromo total	mg/L	5,0
Mercúrio	mg/L	0,1
Prata	mg/L	5,0
Selênio	mg/L	1,0
Fluoreto	mg/L	150,0

Parâmetros complementares borra da ETE.

Parâmetros	Unidade	Valor máximo permitido (VMP)
pH 1:1	–	2,0-12,5
Substâncias solúveis em hexano	%	-

Parâmetros complementares borra da refinaria.

Parâmetros	Unidade	Valor máximo permitido (VMP)
pH 1:1	–	2,0-12,5
Ponto de fulgor	°C	60(a,d)
Sulfeto (como H ₂ S)	mg/Kg	500(c)
Cianeto (como HCN)	mg/Kg	250(c)

ANEXO 4 - Projeto Inova Talentos – CNPQ/IEL

Produção da enzima xilanase pelo microrganismo *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de trigo como substrato em fermentação em estado sólido. Fonte: portalnoar.com/iel-rn-aprova-mais-quatro-projetos-para-o-inova-talentos-2015.

IEL-RN aprova mais quatro projetos para o Inova Talentos 2015

Todos os quatro projetos apresentados pelo Instituto Euvaldo Lodi (IEL-RN) para a terceira chamada do Inova Talentos, realizada em dezembro do ano passado, foram aprovados. As iniciativas selecionadas são desenvolvidas com as empresas parceiras: Grande Moinho Potiguar (submetido com dois projetos), NUTRIDAY e BQ MIL.

Além disso, outros três projetos também foram submetidos e aprovados na segunda chamada, que aconteceu em junho de 2014.

No total, o Rio Grande do Norte participa com sete iniciativas inovadoras voltadas para inclusão e ampliação do número de profissionais qualificados em atividades de inovação no setor empresarial.

A divulgação do resultado final com os ganhadores será realizada no dia 19 de janeiro.

Confira a lista dos projetos selecionados:

- “Biotecnologia empresarial: um modelo do sistema de avaliação de desempenho ambiental” e “PRODUÇÃO DA ENZIMA XILANASE PELO MICROORGANISMO *Aspergillus oryzae* UTILIZANDO FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO” (Grande Moinho Potiguar) – 3ª Chamada;
- “Reciclagem (reuso) de recursos hídricos provenientes da indústria de alimentos, para redução do impacto ao meio ambiente e redução de custos de produção” (NUTRIDAY) – 3ª Chamada;
- “Estudo Logístico: Inovação da rede logística na empresa BQMIL” (BQMIL) – 3ª Chamada;
- “DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO SEMI REFRAATÓRIO UTILIZANDO RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERÂMICA” (CENTRO DE TECNOLOGIAS DO GAS E ENERGIAS RENOVAVEIS) – 2ª Chamada;
- “FORMULAÇÃO, MODULAÇÃO E FABRICAÇÃO DE BLOCOS E PISOS INTERTRAVADOS, UTILIZANDO RESÍDUOS DA BRITAGEM DE ROCHAS CALCÁRIAS” (BQMIL) – 2ª Chamada;
- “RECUPERAÇÃO DA ÁGUA DO CONDENSADO” (Coteminas) – 2ª Chamada.

PROGRAMA INOVA TALENTOS

Em parceria com o Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o Programa do IEL tem como objetivo desenvolver a inovação dentro da empresa e possibilitar a entrada de profissionais recém-formados no mercado de trabalho.

Na edição 2014, o edital contou com R\$ 30,5 milhões, sendo R\$ 20 milhões para projetos do SENAI; R\$ 7,5 milhões para projetos do SESI e R\$ 3 milhões em bolsas de pesquisa do CNPq. Confira aqui a tabela completa com os resultados do 3º ciclo

ANEXO 5 – Artigo

Produção de xilanases por fermentação em estado sólido de farelo de trigo utilizando consórcios fúngicos.

PRODUÇÃO DE XILANASES POR CONSÓRCIOS FÚNGICOS E POR ASPERGILLUS ORYZAE E TRICHODERMA RESEI UTILIZANDO FARELO DE TRIGO COMO SUBSTRATO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker^a, Everaldo Silvino dos Santos^a e Gorete Ribeiro de Macedo^a

^a Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande

Campus Universitário Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal/RN- Brasil

Resumo

A fim de se apontar alternativas para destinação do resíduo de farelo de trigo gerado em indústrias do setor alimentício, contribuindo assim com a diminuição do impacto resultante da deposição de resíduos no meio ambiente, avaliou-se no presente trabalho o potencial do farelo de trigo como substrato para produção de enzima xilanase em cultivo em estado sólido, utilizando consórcios fúngicos bem como os fungos *Aspergillus oryzae* CCT n° 0975 (ATCC9362) e *Trichoderma reesei* CCT n° 2768 - QM 9414.

Utilizou-se o farelo de trigo, não lavado e não autoclavado, como fonte de carbono e energia na fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus oryzae* que apresentou maior produção do percentual de proteína nas 72 horas de cultivo. Depois de realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - planejamento fatorial 2³, com três repetições no ponto central e seis pontos axiais - partiu-se para otimização dos fatores que foram considerados significativos no processo: umidade, pH e granulometria. Os fatores foram considerados significativos pela ANOVA com o nível de 95% de confiança e com o resultado otimizado de atividade enzimática de (1.84 ± 0.01) UI/mL utilizando pH 3,3, granulometria de 900,0 µm e umidade de 40%. O caldo enzimático obtido foi considerado eficiente na modificação de tipificação de farinhas de trigo pelo estudo dos parâmetros reológicos do *falling number* e alveografia sendo estável por cerca de 3 meses.

Palavras-chave: produção de xilanases, farelo de trigo, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*.

Contato e-mail : bakker.christiane@gmail.com, Tel.: +55(84) 98809 7550

Christiane Maria Christina Nóbrega Bakker, 04 / 2017

XYLANASE PRODUCTION BY USING WHEAT BRAN AS SUBSTRATE IN SOLID-STATE FERMENTATION

^{1,2}Christiane Maria Christina Nobrega Bakker*, ¹Everaldo Silvino dos Santos, and ¹Gorete Ribeiro de Macedo

¹Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970 Natal, Brazil. ²M. Dias Branco, Co., 59010-700 Natal, Brazil.

Abstract

This study aimed to find alternatives for wheat bran disposal destination generated in food industry sector, thus contributing to the reduction of the resultant impact of residue deposition in the environment. The potential of the wheat bran as a substrate for xylanase production by solid-state fermentation using fungal consortiums as well as *Aspergillus oryzae* (ATCC9362) and *Trichoderma reesei* (2768) was valued. The use of non-washed and non-autoclaved wheat bran as carbon and energy source in solid-state fermentation by *A. oryzae* fungus showed greater percentage of produced protein after 72 h of cultivation. The use of a central composite rotatable design (CCRD), 2³ factorial planning with three repetitions at the central point as well as six axial points, coupled with Surface Response Methodology (SRM) allowed to assay the influence of humidity, pH, and grain size (independent variables or factors) on the xylanase activity (dependent variable or response) as well as to optimize the best conditions for the enzyme production. The results showed that all factors and their combinations were significant at 95% confidence level. The optimized xylanase activity was (1.84 ± 0.01) UI/mL, obtained at 40% humidity and pH 3.3 with a grain size of 900.0 µm. The produced broth was stable for 3 months and approximately had 50% of the initial xylanase activity at 4°C. SDS-PAGE assay showed that xylanase has 30 kDa molar mass. The obtained enzymatic broth was efficient to modify wheat flours as shown by the *falling number* rheologic parameters and alveography assay.

Key-words: Xylanase, wheat bran, *Aspergillus oryza*

1. Introdução

O resíduo da fabricação de farinha de trigo apresenta várias características que possibilitam o seu uso como meio de cultura: são baratos, atendem as necessidades nutricionais do microrganismo, possui características que facilitam o controle do processo, não provocam dificuldades na recuperação do produto, apresentam estabilidade para armazenagem (Schmidell, 2001). Sendo assim, é um potencial substrato para obter produtos comercialmente viáveis por fermentação. As xilanases são enzimas que degradam a xilana, principal componente da hemicelulose vegetal, podendo contribuir para o branqueamento de polpas de celulose reduzindo a utilização de produtos altamente poluentes, na clarificação de sucos e vinhos e na liberação de xilo-oligosacarídeos que podem ser então convertidos em outros produtos de interesse na área de alimentos, entre outras aplicações, Maciel (2006). O objetivo do presente estudo foi utilizar o farelo de trigo (resíduo agroindustrial) como substrato para a fermentação em estado sólido (FES) para produção de xilanases, usando-se os fungos *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*. Após caracterização do substrato, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com a metodologia de superfície de resposta que permitiu otimizar a produção da enzima avaliando-se a viabilidade de uso das xilanases como aditivo na indústria alimentícia.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização dos resíduos

A coleta de amostras para caracterização dos substratos foi realizada na unidade do Grande Moinho Potiguar denominada GMP instalada em Natal-RN. Foram coletados 5 kg de amostra de granulometrias 600 e 1200 μm de farelo de trigo já comercializados como subproduto da fabricação de farinha de trigo. As análises realizadas no farelo de trigo foram: pela metodologia (IAL, 2005) umidade, granulometria, cinzas, proteína total pelo método

Kjeldahl, determinação do pH e determinação dos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina (LAP, 2011).

2.2. Microrganismos, obtenção de esporos e Processo de fermentação em estado sólido (fes)

Foram selecionados dois fungos filamentosos, conhecidos como bons produtores de enzimas a partir de materiais lignocelulósicos, *Aspergillus oryzae* CCT n°0975 - ATCC 9362 e *Trichoderma reesei* CCT n°2768 - QM 9414. As cepas dos microrganismos *Aspergillus* e *Trichoderma* foram adquiridas na coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello em Campinas-SP. Com o substrato farelo de trigo foi realizado ensaio em FES. O processo de fermentação em estado sólido foi conduzido utilizando 12,0 g do substrato (farelo de trigo) nas diferentes condições de pré-tratamento. Nos ensaios 12,0 g dos resíduos foram adicionados de 1,0 mL de cada pré-inóculo e foram incubados a 32°C por 168 h (Santos, 2007).

2.3. Análises para avaliação da obtenção da enzima

2.3.1. Extração da enzima e determinação de proteínas

Na extração da enzima utilizou-se 5,0 g da amostra dos cultivos que foram lavados com 40 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,0. A extração ocorreu em banho-maria a 30°C por 30 min. Em seguida, centrifugou-se por 10 min a 30°C, filtrou-se e solução filtrada foi armazenada a temperatura de 4°C. Na determinação de proteínas existentes no sobrenadante após extração utilizou-se o Método de Bradford (1976). Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se uma modificação do método de DNS proposto inicialmente por Miller (1959). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermospectronic Genesys 10 UV) a 540 nm.

2.4. Atividade enzimática e otimização das condições de cultivo

A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Ghose (1987). Determinou-se concentração de açúcares redutores liberados, espectrofotometro/ Spectrophotometer (Termospectromic, Gensys 10 UV) durante a hidrólise da xilana 1% (*xylan from birch wood - X0502*), pré-incubada 10 min a 50°C em banho – maria (Nova instruments, NI1232). Definiu-se a atividade como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 μmol de xilose/min, nas condições do ensaio. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado e permitiu avaliar a influência dos três fatores (variáveis independentes): pH do meio, granulometria e percentual de umidade na produção de xilanases por fermentação em estado sólido de farelo de trigo usando *A.oryzae*. Nesse caso, utilizou-se como resposta (variável dependente) a atividade xilanásica (UI/mL). Nesse delineamento a parte fatorial consistiu de 8 ensaios, com três repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios (Barros Neto, 2007) que, juntamente com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permitiu localizar o ponto ótimo de atividade. Os resultados do planejamento foram avaliados usando-se o software *Statistica* (v. 7.0 – Stasoft/USA) que permitiu obter os modelos estatísticos. A Tabela 1 apresenta os fatores utilizados, sua codificação e os níveis estudados, no DCCR.

Tabela 1 – Delineamento Composto Central Rotacional: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e seis ensaios axiais com rotabilidade.

Fatores/Codificação	Níveis Codificados				
	($-\alpha = -1,682$)	(-1)	0	(+1)	($+\alpha = +1,682$)
pH/ X_1	3,32	4	5	6	6,68
Granulometria(μm)/ X_2	395,46	600	900	1200	1404,54
Umidade (%)/ X_3	23,18	30	40	50	56,81

2.5. Identificação da enzima xilanase e ensaios de aplicação

2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sds-page)

Preparado gel de poliacrilamida 30% (v/v); Tris-HCl 1,5M, em p H 8,8; Tris-HCl 0,5M, em p H 6,8; Duodecil Sulfato de Sódio 10% -SDS; Persulfato de Amônio 10%- APS) e

armazenados sob refrigeração. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 1:1 perfazendo 100µL de solução, desnaturadas a 90°C por 5 minutos em banho Maria., (Smithies, 1955).

3.0. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do resíduo de farelo de trigo e cultivos em estado sólido do farelo de trigo com variados microrganismos e métodos de preparação do resíduo

Na análise dos valores referentes à umidade e granulometria do resíduo da produção de farinha de trigo, obteve-se umidade de 12,5%, e três granulometrias 600 µm, 1200 µm e uma granulometria mista de 900 µm como subprodutos já comercializados. O pH em média apresentou valores entre 6,0 e 7,0 indicando ser o farelo de trigo bom substrato para síntese de xilanases pois o mesmo possui elevado teor de hemicelulose com valores maior que 40% de hemicelulose. Observado que a partir das 96 horas de fermentação (4º dia) o pH começa a aumentar, tendendo a neutralização.

3.2. Delineamento composto central rotacional (dccb)

A Figura 2 ilustra o DCCR. O fato de todos os efeitos principais dos fatores bem como as interações de segunda ordem mostrar valores significativos ratifica a complexidade da regulação da expressão gênica no cultivo em estado sólido.

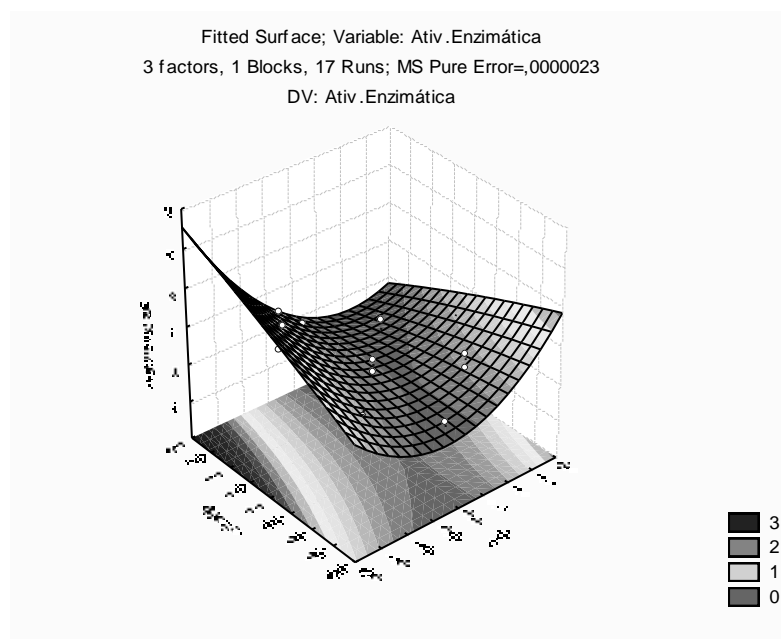


Figura 2 - Superfície de resposta do DCCR da fermentação em estado sólido do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae* à 32 °C e granulometria 900µm - ponto central

Um modelo matemático foi proposto, conforme Equação (1), que permite prever a atividade xilanásica obtida ao se utilizar como substrato farelo de trigo inoculado com *A. oryzae* CCT nº0975 - ATCC 9362 por FES nas condições otimizadas descritas neste experimento.

$$AE = 0,049 - 0,3697X_1 + 0,0399X_2 + 0,0562X_3 + 0,3941X_1^2 + 0,0813X_2^2 - 0,0178X_3^2 - 0,1603 X_1X_2 - 0,2843 X_1X_3 + 0,1768 X_2X_3. \quad (1)$$

O modelo consegue explicar 86,7 % de toda variação em torno da média. A Figura 4 ilustra os valores preditos e os valores observados ao se utilizar esse modelo. Observa-se que, considerando a complexidade da FES, foi obtido um bom ajuste.

3.3. ELETROFORESE (SDS-PAGE)

Na Figura 3 apresenta-se a identificação das proteínas por eletroforese revelada em gel de poliacrilamida 30% e desnaturadas em SDS. o caldo obtido nesta pesquisa apresentou imagens em várias bandas protéicas, logo não purificado. Sendo mais intensa na região do extrato de massas molecular 14,4KDa que refere-se a representação do padrão da α -Lactalbumina (Titani *et al.*, 1977).

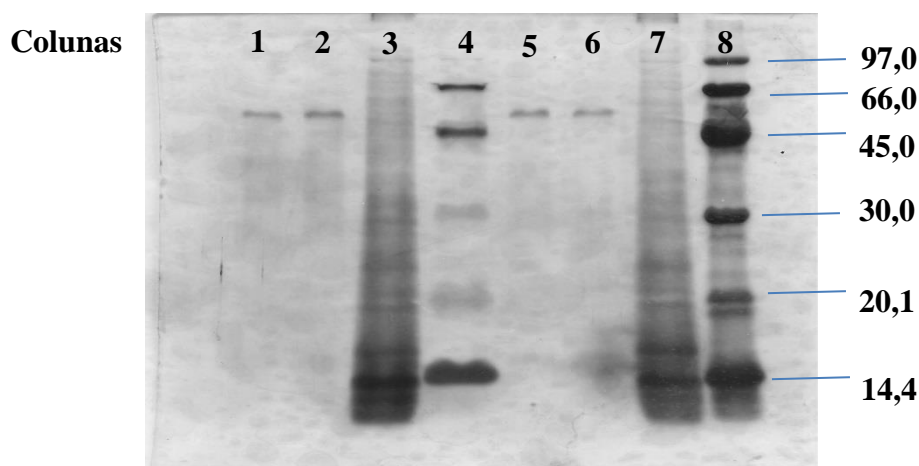


Figura 3 –Caracterização de proteínas no ensaio de FES do farelo de trigo por *Aspergillus oryzae*. O extrato da proteína é apresentado nas colunas 3 e 7, enzima comercial denominada Germix colunas 1,2,5 e 6. Traçadores indicam os padrões de massas moleculares: 97,0 KDa - Fosforilase; 66,0 KDa - Albumina; 45,0KDa – Ovalbumina carbônica; 30,0KDa – Anidrase; 20,1KDa – Inibidor de tripsina e 14,4KDa – α - Lactalbumina.

4-CONCLUSÃO

O DCCR utilizado para otimizar a produção de xilanases usando farelo de trigo como substrato e *A. oryzae* CCT n° 0975 (ATCC9362) cultivado em fermentação em estado sólido, mostrou que todos os parâmetros estudados: pH, umidade e granulometria, foram considerados significativos com 95% de confiança. O pH do cultivo foi o parâmetro que mais influenciou à atividade da enzima e sua redução favorece o processo. A atividade enzimática da xilanase de (4,54 UI/mL) foi obtida em condição otimizada de pH 3,3, granulometria de 900,0 μ m e umidade de 40%.

O caldo produzido apresentou-se estável por 3 meses, mantendo-se aproximadamente 50% da atividade da xilanase inicial após 6 meses de armazenagem. O extrato enzimático adicionado a farinha padrão realizou alterações de parâmetros reológicos da farinha *falling number* e alveografia ao ponto de reclassificá-la na tipificação da área de alimentos de farinha para massas para farinha adequada a panificação.

5-BIBLIOGRAFIA

- BARROS NETO, B. de. 2007. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª edição, Campinas, SP: Editora da Unicamp, p.480.
- BRADFORD, M. M. 1976. A Rapide and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72, p.248-255.
- CARVALHO, W. E SILVA, J.B. 2002. Caracterização do hidrolisado de palha de trigo visando extração da xilose para bioconversão em xilitol. VII encontro Latino Americano de Iniciação Científica. Faculdade de Eng. Química de Lorena, Departamento de biotecnologia. São Paulo. p.1221-1224.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. 1987. *Pure Appl. Chem.*, 59:257-268.
- IAL, Instituto Adolfo Lutz. 2005. Métodos físicos-químicos para análise de alimentos, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 14. ed. Brasília: Ed. MS.
- LAP, Laboratory Analytical procedure. 2011. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. A . Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. Version 07.08.2011.
- MACIEL, G. M. 2006. Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação n estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. Dissertação de mestrado na área de processos biotecnológicos Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- SANTOS, S.F.M. 2007. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese doutorado. Programa de pós graduação em engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.
- SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. de A. e AQUARONE, E. 2001. Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica. São Paulo: Editora Blucher, p.541.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels. *Biochem.J.* v. 61, p.629-641.
- XIONG, H. 2004. Production and characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces lanuginosus* xylanases. Espoo, Helsinki University of Technology.