

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ADAIR DEOMAR BERNARDI

**EFEITOS DA TEMPERATURA E DA UMIDADE NO CULTIVO DE *Pleurotus
albidus* EM CRUEIRA DE MANDIOCA SOBRE A ATIVIDADE DE β -
GLICOSIDASES**

São Miguel do Oeste – SC

2019

ADAIR DEOMAR BERNARDI

EFEITOS DA TEMPERATURA E DA UMIDADE NO CULTIVO DE *Pleurotus albidus* EM CRUEIRA DE MANDIOCA SOBRE A ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Alimentos do Câmpus São Miguel do Oeste do Instituto Federal de Santa Catarina para obtenção do diploma de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr.
Fernando Sanches de Lima

Coorientadora: Profa. Dra.
Danielle Cristina B. H.
Ferreira

São Miguel do Oeste – SC
2019

EFEITOS DA TEMPERATURA E DA UMIDADE NO CULTIVO DE *Pleurotus albidus* EM CRUEIRA DE MANDIOCA SOBRE A ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASES

ADAIR DEOMAR BERNARDI

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e aprovado na sua forma final pela comissão avaliadora abaixo indicada.

São Miguel do Oeste, 04 de dezembro de 2019

_____ Professor, Doutor Fernando Sanches de Lima

_____ Professora, Doutora Thais Regina Baú

_____ Professora, Doutora Fernanda Stoffel

As assinaturas da banca estão devidamente registradas na ata de defesa, arquivada junto à Coordenação do Curso.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1	Processamento da mandioca, obtenção e composição da crueira.....	8
3.2	β -glicosidases de fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	11
3.3	Cultivo em estado sólido do gênero <i>Pleurotus</i> para a produção de β -glicosidases.....	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1	Preparo da crueira e cultivo em estado sólido.....	15
4.2	Extração e determinação da atividade de β -glicosidases	16
4.3	Análise estatística.....	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6	Conclusão	20
	REFERÊNCIAS.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química da crueira.....	11
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^2 aplicado ao cultivo de <i>Pleurotus albidus</i> em crueira de mandioca por 14 dias.....	16
Tabela 3 - Planejamento fatorial 2^2 aplicado ao cultivo de <i>Pleurotus albidus</i> em crueira de mandioca por 14 dias	18
Tabela 4 - ANOVA do modelo gerado a partir do planejamento fatorial	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do beneficiamento da mandioca.....	9
Figura 2 - Separação da farinha e crueira.....	10
Figura 3 - Esquema de reações catalisadas por β -glicosidasases.....	11
Figura 4 - Morfologia dos fungos.....	13
Figura 5 - Superfície de resposta gerada em função da umidade da crueira (x_1) e temperatura de cultivo (x_2) por 14 dias com <i>Pleurotus albidus</i>	19

RESUMO

O processamento da mandioca envolve a produção de diversos resíduos, tais como a crueira, constituída basicamente por amido e fibras. O cultivo em estado sólido do fungo *Pleurotus albidus* em resíduos agroindustriais tem sido uma das estratégias para a produção de enzimas de interesse industrial. Portanto, esse fungo pode ser utilizado em crueira para hidrolisar amido e celulose durante a sua fase de micélio vegetativo. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi investigar a influência da temperatura e da umidade de cultivo de *Pleurotus albidus* em crueira de mandioca sobre a produção de β -glicosidases. Dessa forma, o cultivo foi realizado por 14 dias sob diferentes combinações de umidade (x_1) da crueira e temperatura (x_2) de cultivo utilizando um planejamento fatorial completo 2^2 . A atividade dessa enzima foi determinada por espectrofotometria utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. De acordo com a análise de regressão e de variância (ANOVA) a umidade da crueira apresentou um efeito negativo significativo ($p < 0,05$) sobre a atividade de β -glicosidases, enquanto que a temperatura não teve efeito significativo sobre essa variável resposta. Após análise de regressão dos dados foi obtido um modelo linear com R^2 de 0,80. A partir da combinação $x_1 = -1$ (60%) e $x_2 = 0$ (25 °C), foi estimado um valor de atividade de β -glicosidases de 0,0310 UA/g. Esse resultado potencializa a utilização de *Pleurotus albidus* no processo de conversão de celulose e hemicelulose na crueira com baixa umidade e em temperatura ambiente. Esse estudo pode contribuir para a viabilização posterior da extração, purificação e aplicação dessas enzimas.

Palavras-chaves: Amido, celulose, fungos,

1 INTRODUÇÃO

Durante o processamento da mandioca diversos resíduos sólidos e líquidos são gerados, tais como a crueira, que possui aproximadamente 80% de amido e 7% de fibras em base seca (NEVES et al. 2008).

Um dos grandes problemas encontrados com a manufatura da mandioca é o destino dos resíduos resultantes do seu processamento. Os resíduos sólidos são a casca marrom, a entrecasca, o descarte, a crueira, a fibra, o bagaço e a varredura oriundos da varrição, descascamento, e peneiramento, e os resíduos líquidos, entre eles a manipueira, oriundos da lavagem e prensagem, se não sofrerem destinação correta, possuem grande capacidade de impactar o meio ambiente de forma agressiva. Além disso, existe a possibilidade de agregação de valor ao resultado final, através do reaproveitamento desse material, evitando desperdício.

A maior produção de mandioca acontece em países próximos à linha do Equador nos países da América Latina, Caribe, África e Ásia. De acordo com o último levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) referente ao ano de 2016, a produção mundial de raiz de mandioca correspondeu a 277,1 milhões de toneladas. O maior produtor mundial é a Nigéria, que no ano de 2016 computou 57,13 milhões de toneladas, seguido por Tailândia e Indonésia. O Brasil é o 4º maior produtor mundial com 21,08 milhões de toneladas dessa tuberosa. (CONAB – 01/2018). No cenário nacional o Estado do Pará possui a maior produção com 20,55% da fatia nacional, seguido pelo Estado do Paraná com 14,79%. Depois vem o Estado da Bahia na 3ª colocação com 10,09% e o Maranhão, com modestos 6,38% ocupando a 4ª colocação no ranking nacional. Os demais estados da Federação Brasileira, juntos, detêm pouco mais de 48% da produção nacional de mandioca (EMBRAPA– 2018).

O cultivo em estado sólido de fungos em resíduos agroindustriais tem sido uma das estratégias promissoras de valorizar esses resíduos, por meio da produção de enzimas (CAMPOS JUNIOR, 2013). O cultivo ou fermentação em estado sólido é um bioprocessamento realizado em um meio com umidade reduzida, mas que permita o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo inoculado (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

O fungo *Pleurotus albidus* tem sido estudado para produção de enzimas e de compostos fenólicos na sua fase de crescimento de micélio vegetativo. É facilmente

encontrado em troncos caídos, com a cor variando de branca ao marrom. A espécie já foi relatada no México e Argentina. No Brasil foi identificada na região Sul do país, no Estado do Amapá e recentemente no Amazonas (KIRSCH, 2013). Nesse contexto, a crueira pode ser valorizada como matéria prima para a produção de enzimas celulases, tais como as β -glicosidases, que podem ter aplicação na produção de bebidas, bioetanol, produtos panificados, compostos de interesse farmacológico, etc. (FIGUEIREDO, 2017).

β -glicosidases, juntamente com a exoglucanase e endoglucanase pertencem à classe das hidrolases e são biocatalisadores altamente específicos capazes de atuar sobre um material celulósico sendo responsáveis pela sua degradação, realizada por meio de um processo de quebra das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose que formam a celulose.

Estas enzimas celulolíticas atuam em cooperação sinérgica e têm sido descritas como pré requisito para uma degradação completa e eficiente da celulose, todavia os mecanismos moleculares envolvidos neste processo não são ainda completamente compreendidos (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013)

Uma vez que o cultivo em estado sólido pode ser influenciado pela umidade da crueira e pela temperatura de cultivo de *Pleurotus albidus*, o objetivo desse trabalho foi investigar, por meio da metodologia de superfície de resposta, a influência desses parâmetros sobre a atividade de β -glicosidases sintetizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a influência da temperatura e da umidade de cultivo de *Pleurotus albidus* em crueira de mandioca sobre a produção de β -glicosidases.

2.2 Objetivos específicos

Estimar as atividades de β -glicosidasas, na crueira de mandioca submetida a diferentes combinações de umidade e temperatura de cultivo de *Pleurotus albidus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processamento da mandioca, obtenção e composição da crueira

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é uma raiz cultivada tipicamente em países tropicais e é responsável pela alimentação de mais de 800 milhões de pessoas (CERATTI, 2015). Na década de 70, o Brasil ocupou a primeira posição na produção desta raiz tuberosa, e a partir de 2017 tem apresentado a terceira maior produção mundial, com 20,6 milhões de toneladas (IBGE - Censo agropecuário - 1996/2016).

A mandioca é importante para a agricultura catarinense. No Sul do estado, as farinheiras e fecularias são responsáveis por processar a mandioca para a produção de amido, fécula e polvilho, apresentando um importante papel socioeconômico (CARDOSO, 2005; ARAÚJO et al. 2014).

A indústria de mandioca, no Brasil, tornou-se conhecida em função da característica da produção, tradicionalmente pelas casas de farinha e fecularias (CARDOSO, 2005). De acordo com Del Bianchi (1998), os principais resíduos gerados no processamento da mandioca podem ser divididos em líquidos e sólidos. Os resíduos líquidos incluem água de lavagem, manipueira (água vegetal ou água de prensa) e água de extração de fécula, enquanto que os resíduos sólidos são constituídos por casca, entrecasca e crueira.

Durante o processamento da mandioca, parte do material a ser peneirado fica retido na peneira e é denominado de crueira (figura 1), constituída principalmente por pedaços de raízes, fragmentos mais grosseiros e entrecasca de mandioca (TAGLIARI, 1996; NEVES et al. 2008).

Ressalta-se que a massa de mandioca é prensada para a diminuição da sua umidade e, em seguida, é compactada e esfarelada antes da peneiração. Posteriormente, a massa é peneirada com retenção dos maiores fragmentos, ou seja, a crueira (figura 2), que é o fragmento ou o conjunto de fragmentos mais grosseiros da massa esfarelada de mandioca retido durante a peneiração (ZOLDAN, 2006).

Como a crueira é um resíduo das farinheiras na produção de farinhas, esta geralmente é descartada na peneiragem. Como produto de descarte, a mesma é subutilizada, pois mesmo seguindo para venda, usada como ração animal ou mesmo descartada ao solo como adubo orgânico, o seu aproveitamento é insípido, não agregando valor absoluto como resíduo aproveitável.

Figura 1 - Fluxograma do processo de beneficiamento da mandioca para obtenção de farinha.



Fonte: ZOLDAN,2006

De acordo com Cereda (1994, *apud* PEREIRA JUNIOR et al. 2013), apesar de não existirem dados absolutos a respeito da quantidade produzida deste resíduo, estima-se que 10% da mandioca utilizada na fabricação de farinha é eliminada na forma de crueira.

Conforme já adiantou Del Bianchi (1998), “várias oportunidades podem ser implementadas visando o aproveitamento desses resíduos, com maiores rentabilidades financeiras para as farinheiras”.

Figura 2 – Separação da farinha e crueira



Fonte: NEVES, 2004

A crueira possui percentual elevado de amido (81,1%) e fibras (7,39%), conforme apresentado na Tabela 1. Contudo, essa composição pode variar de acordo com a cultivar de mandioca e as condições de processamento de cada indústria.

Nesse contexto, a crueira é uma matéria prima que fornece condições ideais para o cultivo de fungos com a proposta de produção de enzimas de interesse industrial, tais como as β -glicosidases.

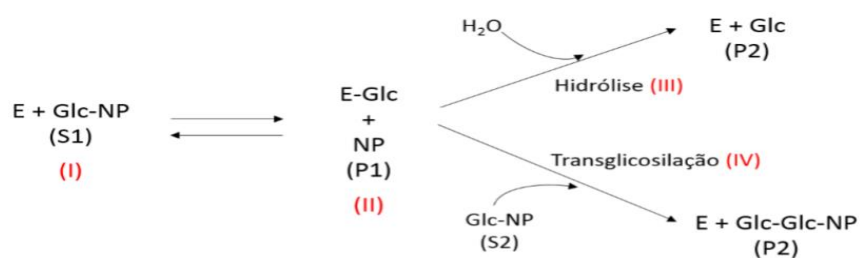
Tabela 1 - Composição físico-química da crueira

Componentes	Média
Umidade (%)	15,5
% base seca	
Amido	81,1
Fibras	7,39
Cinzas	0,90
Proteínas	1,41
Matéria graxa	0,44
Açúcares solúveis totais	2,24

Fonte: NEVES et al. 2008.

3.2 β -glicosidases de fungos do gênero *Pleurotus*

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas de oligo ou polissacarídeos em glicose e frações agliconas (LYND et al., 2002; LYND; ZHANG, 2002).

Figura 3 - Esquema de reações catalisadas por β -glicosidases.

(E) = enzima. (Glc-NP) = para-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. (Glc) = glicose. (NP) = para-nitrofenolato. (S1) = primeiro substrato. (S2) = segundo substrato. (P1) = primeiro produto formado. (P2) = segundo produto formado.

Fonte: (Adaptado de FRUTUOSO e MARANA, 2013).

Na área de produção de etanol de segunda geração, as β -glicosidases apresentam um papel importante para a hidrólise da celulose e hemicelulose de resíduos agroindustriais em açúcares fermentescíveis. Destaca-se que essas enzimas

podem ser utilizadas também para melhorar o sabor de sucos de frutas e vinhos devido à hidrólise de terpenos glicosilados (LEITE, 2007).

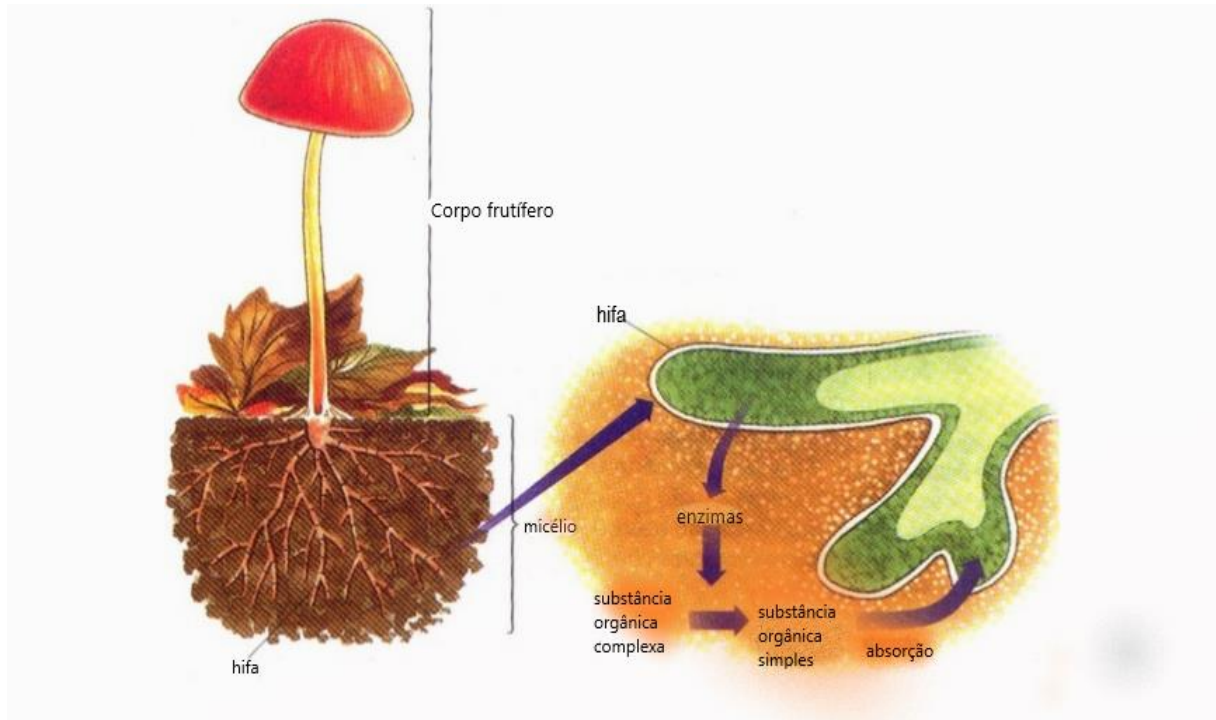
Em alimentos, como na panificação, catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados. Essa enzima atua na hidrólise da celobiose em glicose, no processo de conversão da celulose em glicose em combinação com outras enzimas celulolíticas e são sintetizadas por animais, vegetais, bactérias e fungos (BEDANI, 2010). O interesse em β -glicosidases fúngicas é devido a possibilidade de produção em alta escala, além de apresentarem maior atividade e estabilidade térmica em relação às encontradas em vegetais (SANTOS, 2010).

Dentre os fungos produtores dessas enzimas destacam-se os do gênero *Pleurotus*. Estas espécies são relatadas como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulasas, β -glicosidase, xilanases, lacases, manganêspoxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (T.C. dos SANTOS et al. 2013).

O *Pleurotus albidus* possui a seguinte classificação taxonômica (PUTZKE; PUTZKE, 2004): Reino: *Fungi*, Filo: *Basidiomycota*, Classe: *Basidiomycetes*, Ordem: *Agarcales*, Família: *Polyporaceae*, Gênero: *Pleurotus*, Espécie: *Pleurotus albidus*. É comumente encontrado em troncos caídos, raramente em árvores vivas. As características morfológicas incluem píleo circular, infundibuliforme, glabro, cor branca a creme, às vezes apresenta cor marrom próximo ao encontro do estipe, margem inteira à crenada, fina, geralmente encurvada. As lamelas são decurrentes e brancas, estipe branco, geralmente curvado ascendentemente, ocasionalmente com pelos na base e esporada branca a creme (LECHNER et al 2004). É uma espécie encontrada no México, na Argentina e no Brasil (KIRSCH, et al. 2016) e por isso deve ser ainda mais explorado pelos pesquisadores da América do Sul.

Durante a fase de crescimento do micélio vegetativo de fungos (figura 4), a produção de enzimas é intensa (SILVA, 2016).

Figura 4 - Morfologia dos fungos



Disponível em: <<https://image.slidesharecdn.com/reinofungi2ano-120501165522-phpapp02-130822131121-phpapp02/95/reino-fungi-4-638.jpg?cb=1377177153>> acesso em 30 maio 2019.

As fontes de carbono preferidas durante o crescimento micelial são o amido, glucose, frutose, maltose, manose, sacarose, pectina, celulose e lignina. As fontes de nitrogênio utilizadas pelo micélio do gênero *Pleurotus* são peptona, farinha de soja, milho moído, extrato de levedura, sulfato de amônio, asparagina, serina, alanina e glicina. As temperaturas para crescimento do micélio são cerca de 24 a 28 °C e a variação de pH entre 5,5 e 6,5 (VIEIRA, 2001).

As necessidades de luminosidade do micélio são diferentes ao longo dos vários estágios de crescimento. O crescimento micelial não necessita de qualquer tipo de luz, e o cultivo em lugares escuros tem sido melhor do que luminosos (VIEIRA, 2001).

Há uma ampla variedade de resíduos vegetais, tais como serragem, palha, bagaços, sabugos de milho, algodão, folhas e cascas de banana, arroz e café, que são fonte de carbono e nitrogênio necessárias para o cultivo de fungos (VIEIRA, 2001). Nesse contexto, a crueira de mandioca pode ser uma matéria prima promissora para o cultivo de *Pleurotus albidus* para a produção de β -glicosidases, pois possui alto teor

de amido e baixo teor de cinzas, tornando-a um substrato potencialmente adequado aos processos biotecnológicos de bioconversão (FERRAZ et al. 2016). Contudo, condições de umidade da crueira e temperatura de cultivo necessitam ser investigadas para avaliar os efeitos sobre a atividade das enzimas β -glicosidases produzidas.

3.3 Cultivo em estado sólido do gênero *Pleurotus* para a produção de β -glicosidases

Fermentação ou cultivo em estado sólido é um método adotado para realizar o crescimento de microrganismos em meios de cultivo ou substratos com conteúdo e atividade de água reduzidos. Assim sendo, os fungos filamentosos são os que têm melhor crescimento nessas condições, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (Durand, 2003). O substrato na fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes necessários ao desenvolvimento do microrganismo (PINTO et al, 2005).

Destaca-se que o tipo de enzima produzida dependerá da composição do substrato. O crescimento do microorganismo pode ocorrer na superfície ou em todo substrato, dependendo da porosidade e da umidade do substrato (GERVAIS, MOLIN, 2003; MOO-YOUNG et al, 1983). Convém que os substratos contenham umidade suficiente para que possa ocorrer o crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microrganismo.

Condições de cultivo em estado sólido de fungos do gênero *Pleurotus* para a produção de β -glicosidases são destacados em Alexandrino et al (2007), para o substrato de resíduos de laranja, com 85% de umidade e temperatura de cultivo de 28 °C, a melhor condição para produção de β -glicosidases ficou em 28 °C e umidade de 80%. Zamora (2017) relata que em substrato de *Alstroemeria*, uma bulbosa da América do Sul, as condições de cultivo com umidade inata de 10,1% e temperatura entre 24 e 32 °C, teve a melhor condição para β -glicosidases com alta concentração de substrato. Para Cardoso, (2012), os fungos do gênero *Pleurotus* apresentaram temperatura de máxima atividade a 40 °C. E, por último, Fernandes (2012) atesta 28 °C para o substrato, com umidade de 65%, e 25 °C como melhor condição para produção de β -glicosidases.

As vantagens do cultivo em estado sólido são que o sistema desfavorece o crescimento de bactérias, por serem mais exigentes, e leveduras. Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois utilizam pouca água e muitos sólidos presentes (DURAND, 2003), não necessita de agitação e aeração, além de não gerar efluentes e possuir baixo custo de operação (ZAMORA, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da crueira e cultivo em estado sólido

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de análise instrumental, microbiologia e bromatologia do Instituto Federal de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste - SC.

A amostra de crueira bruta foi cedida por duas farinheiras vinculadas à Associação das Indústrias Processadoras de Mandioca e Derivados de Santa Catarina (AIMSC) e foi recebida com umidade de 79,8%. Esta foi previamente seca em estufa de circulação de ar forçado a 70° C, por 12 horas até atingir umidade de 24,1 %, triturada em moinho de facas para padronizar a granulometria, e armazenada sob refrigeração entre 4 a 7° C, durante todo o estudo experimental.

A cepa utilizada *Pleurotus albidus* 88F-13, fora disponibilizada da Micoteca do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul/UCS-RS, já em fase micelial viável para cultivo.

Em seguida, a umidade da crueira foi ajustada a diferentes valores e discos de 1 cm de diâmetro de *Pleurotus albidus* 88F-13 em fase micelial foram inoculados para o cultivo por 14 dias, utilizando um planejamento fatorial 2² (tabela 2), conforme realizado por Becker, Zenaro e Cadoná (2018).

Depois dos 14 dias de cultivo, as amostras foram incubadas em estufa BOD (CIENLAB, CE-300/360-AU, Brasil) em temperatura pré-estabelecida variando entre 18 a 32° C ($\pm 1^\circ$ C) e umidade variando de 56 a 84 % ($\pm 1\%$). Ao final, as amostras de crueira de cada frasco foram congeladas, liofilizadas (Liobras, L101, Brasil), trituradas em moinho analítico (Ika 11 basic, St. Louis, MO, EUA) e mantidas a -18 °C até a extração e determinação da atividade de β -glicosidases.

Tabela 2 – Planejamento fatorial 2^2 aplicado ao cultivo de *Pleurotus albidus* em crueira de mandioca por 14 dias

Ensaio	Variáveis independentes*	
	x_1 (X_1)	x_2 (X_2)
01	-1 (60%)	-1 (20 °C)
02	+1 (80%)	-1 (20 °C)
03	-1 (60%)	+1 (30 °C)
04	+1 (80%)	+1 (30 °C)
05	0 (70%)	0 (25 °C)
06	0 (70%)	0 (25 °C)
07	0 (70%)	0 (25 °C)

* x_1 e x_2 são níveis codificados; X_1 = umidade da crueira e X_2 = temperatura de cultivo

4.2 Extração e determinação da atividade de β -glicosidases

A extração das enzimas β -glicosidase foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lima, Kurozawa e Ida (2014), com algumas modificações. Aproximadamente 0,4 g de amostras liofilizadas de crueira foi transferida para tubos falcon de 50 mL e adicionados 6 mL de tampão citrato 0,05 mol/L (pH 4,5) contendo NaCl 0,1 mol/L. Esses tubos foram agitados em mesa agitadora orbital (Solab, SL-180/A, Brasil) por 1 h a 100 rpm e 25 °C. Em seguida, após essa mistura ser devidamente homogeneizada, foi transferida para tubos centrífuga, 2 mL, e centrifugada (Herexi, HR/T16 M, China) por 10 min a $18200 \times g$ e 4 °C e obtidos os extratos enzimáticos.

Em tubos de ensaio foi pré-incubado, em banho maria, 0,4 mL de extratos enzimáticos por 10 min a 30 °C, e, em seguida, adicionados a esses tubos 1,6 mL de solução de substrato para-nitrofenil beta-D-glicopiranosídeo (*p*-NP β G) a 1 mmol/L feita em tampão acetato 0,1 mol/L pH 4,7. Essa reação enzimática foi processada por 30 min a 30 °C. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ a 0,5 mol/L e realizada leitura da absorvância em espectrofotômetro (Biospectro, SP22 Curitiba - PR, Brasil) a 400 nm. Ensaio foram realizados para avaliar a absorvância de cada extrato enzimático sem a reação enzimática, com a incubação de 0,4 mL de extrato enzimático e 1,6 mL de tampão

acetato 0,1 mol/L a pH 4,7. O ensaio branco foi construído por todos os reagentes menos as amostras.

Em paralelo construiu-se uma curva analítica do produto da reação enzimática, para-nitro fenol (p-NP), com concentração variando de 0,004 a 0,032 $\mu\text{mol/mL}$. Uma unidade de atividade de β -glicosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar o substrato p-NP β G e liberar 1 μmol de p-NP por minuto de reação.

4.3 Análise estatística

Os efeitos das variáveis independentes de umidade da crueira (x_1) e da temperatura de cultivo (x_2) sobre a função resposta da atividade de β -glicosidases (Y) foram investigados por um planejamento fatorial completo, por meio do seguinte modelo linear: (Eq. 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + e \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: Y = função resposta, x_1 e x_2 = níveis codificados das variáveis independentes, β = coeficientes de regressão, e = erro experimental.

O modelo foi obtido por meio de regressão linear e submetido à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). O gráfico de superfície de resposta foi gerado a partir do modelo ajustado aos dados experimentais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da umidade da crueira (x_1) e da temperatura de cultivo (x_2) sobre a atividade de β -glicosidases foram investigados por meio dos dados experimentais e modelagem matemática, tal como apresentado na Tabela 3:

Tabela 3 – Planejamento fatorial 2^2 aplicado ao cultivo de *Pleurotus albidus* em crueira de mandioca por 14 dias

Ensaio	Variáveis independentes*		Variável resposta	
	x_1 (X_1)	x_2 (X_2)	UA de β -glicosidases/g de crueira	
			$Y_{\text{experimental}}$	Y_{estimado} (Eq. 1)
01	-1 (60%)	-1 (20 °C)	0,0311	0,0295
02	+1 (80%)	-1 (20 °C)	0,0125	0,0164
03	-1 (60%)	+1 (30 °C)	0,0285	0,0324
04	+1 (80%)	+1 (30 °C)	0,0209	0,0193
05	0 (70%)	0 (25 °C)	0,0266	0,0244
06	0 (70%)	0 (25 °C)	0,0260	0,0244
07	0 (70%)	0 (25 °C)	0,0255	0,0244

* x_1 e x_2 são níveis codificados; X_1 = umidade da crueira e X_2 = temperatura de cultivo

Os resultados de $Y_{\text{experimental}}$ expressam a atividade enzimática determinada por meio da análise espectrofotométrica. Esses dados foram submetidos à regressão linear e se obteve o seguinte modelo estatístico (Eq. 2):

$$Y_{\text{estimado}} = 0,024442 - 0,006544x_1 + 0,001444x_2 \quad (R^2 = 0,80), \quad \text{Eq. 2}$$

Esse modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,80, indicando que 80 % da variabilidade da atividade de β -glicosidases é explicada pela variabilidade da umidade da crueira e temperaturas empregadas no cultivo do *Pleurotus albidus*. Portanto, o R^2 é influenciado pela diferença observada entre os valores experimentais de atividade ($Y_{\text{experimental}}$) e os valores preditos ou estimados pelo modelo matemático (Y_{estimado}).

De acordo com a análise de regressão e de variância (ANOVA) a umidade da crueira apresentou um efeito negativo significativo ($p < 0,05$) sobre a atividade de β -glicosidases, enquanto que a temperatura não teve efeito significativo sobre essa variável resposta (Tabela 4).

Tabela 4 – ANOVA do modelo gerado a partir do planejamento fatorial.

Fator	Grau de liberdade	SS	MS	F	p
x_1	1	0,000171	0,000171	15,45	0,017*
x_2	1	0,000008	0,000008	0,75	0,43
Erro	4	0,000044	0,000011	-	-

*Fator significativo ($p < 0,05$).

Esse efeito pode ser evidenciado por meio do gráfico de superfície de resposta (Figura 5), onde se observa que à medida que a umidade da crueira diminui é estimado um aumento na atividade de β -glicosidases.

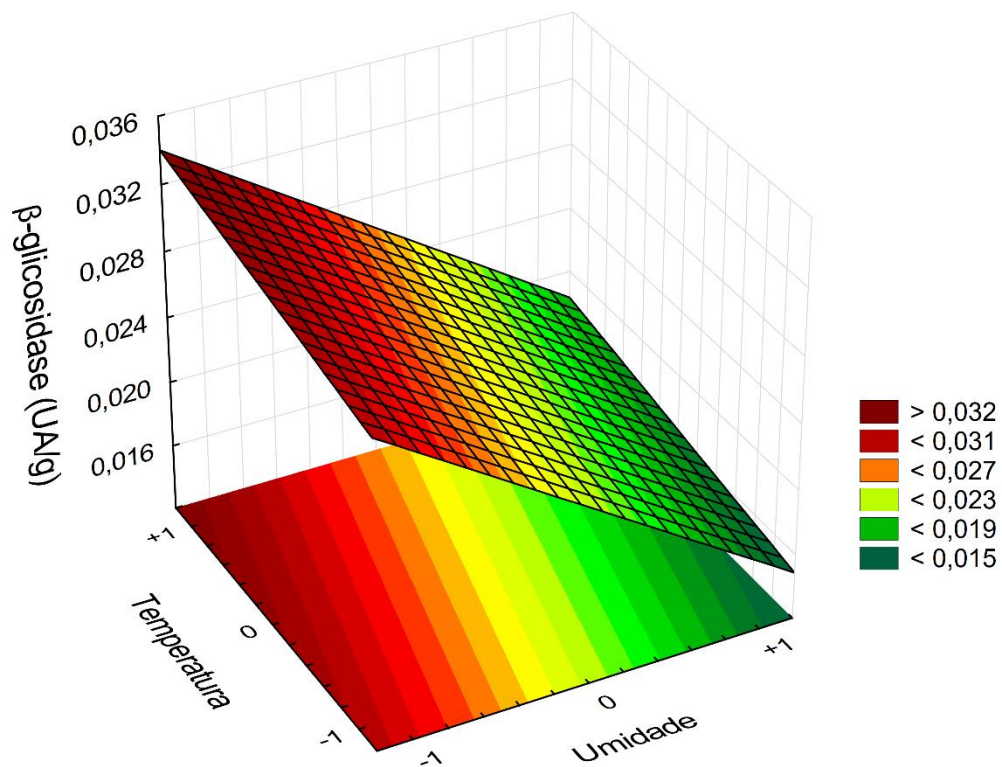


Figura 5 – Superfície de resposta gerada em função da umidade da crueira (x_1) e temperatura de cultivo (x_2) por 14 dias com *Pleurotus albidus*.

$x_1 = -1$ (60%), 0 (70%) e +1 (80%); $x_2 = -1$ (20 °C), 0 (25 °C) e +1 (30 °C)

A partir da combinação $x_1 = -1$ (umidade da crueira de 60%) e $x_2 = 0$ (temperatura de cultivo de 25 °C), por exemplo, é estimado um valor de atividade de β -glicosidases de $Y_{\text{estimado}} = 0,0310$ UA/g, com base no cálculo realizado pela Eq. 2.

Esse resultado potencializa a utilização de *Pleurotus albidus* no processo de conversão de celulose e hemicelulose na crueira com baixa umidade e em temperatura ambiente, uma vez que a temperatura não apresentou influência significativa sobre a atividade da referida enzima. Isso minimiza custos com resfriamento ou aquecimento do substrato durante o cultivo. Resultados obtidos por Zamora (2017) em que no resíduo de Alstroeméria, a produção de β -glicosidases foi superior a outras enzimas na variação de temperatura entre 24 °C a 32 °C e umidade $10,1 \pm 0,27$, corrobora os resultados da pesquisa no que tange à umidade. É muito variável o teor de umidade para o cultivo em estado sólido, pois o resultado depende da natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (PANDEY et al. 2000). Geralmente fungos precisam de menor umidade, sendo que 40-60% pode ser suficiente (SINGHANIA et al. 2009).

Castro e Pereira Jr, 2010 afirmam que a umidade pode variar de 30-85%.

Devido a crueira possuir concentração elevada de amido houve predominância na produção de amilases durante o cultivo de *Pleurotus albidus*, com consequente formação de açúcares redutores, tal como observado por Becker et al. (2018). Assim sendo, o baixo teor de compostos lignocelulolíticos na crueira faz com que as β -glicosidases não sejam as enzimas produzidas prioritariamente por esse macrofungo. Grande parte das β -glicosidases conhecidas é fortemente inibida por glicose (SOUZA et al. 2013; MELEIRO et al. 2014; YUN et al. 2001; HOH, YEOH, TAN, 1992). Destaca-se que o excesso de açúcares redutores produzido ao longo do cultivo pode ter reduzido a atividade dessas enzimas pelo fenômeno de inibição pelo produto sendo um fator limitante de sua eficácia para o resultado final (SOUZA et al. 2013).

6 CONCLUSÃO

A produção de β -glicosidases por *Pleurotus albidus* em crueira de mandioca foi estimulada em umidade baixa, enquanto que a temperatura de cultivo não exerceu efeito significativo sobre a síntese dessas enzimas. A concentração baixa de compostos lignocelulolíticos também pode ter influenciado a atividade de β -glicosidases. Portanto, é necessário investigar condições de cultivo com umidade

mais baixa e outra faixa de temperatura que promova a máxima produção dessas enzimas para viabilizar a sua extração, purificação e aplicação posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, Ana Maria et al . Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 27, n. 2, p. 364-368, jun. 2007 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000200026&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 10 jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200026>
- ARAÚJO, N.C et al., Quantificação da geração de resíduos em uma casa de farinha no Estado da Paraíba. **Revista Monografias Ambientais** - REMOA v.13, n.5, p.3793-3799, 2014.
- BECKER, A.; ZENARO, E.; CADONÁ, L. L. Bioconversão de resíduos lignocelulósicos. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMA DE INTERESSE INDUSTRIAL ATRAVÉS DO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO *DE PLEUROTUS ALBIDUS* EM CRUEIRA. **Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)** IFSC – São Miguel do Oeste, 2018.
- BEDANI, C. C, Produção, caracterização e purificação de β -glicosidasas fúngicas e sua ação sobre a hidrólise de amigdalina, celobiose e p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo / Campinas, SP: [s.n], 2010.
- CAMPOS JUNIOR, F. A. S. Perfil dos compostos fenólicos em cogumelos comestíveis produzidos no Brasil. 2013. 81 f. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- CARDOSO, É. Uso de Manipueira Como Biofertilizante no Cultivo do Milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pósgraduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 67 p. 2005.
- CARDOSO, W. S. - Obtenção e caracterização de celulases de fungos da podridão branca em fermentação no estado sólido e sacarificação da palha de sorgo visando a produção de etanol – **Tese para obtenção do título de Doctor Scientiae**. - Viçosa, MG, Xiv, 111f.; 2012
- CASTRO, AM de; PEREIRA JR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010
- CERATTI M. Mandioca: um cultivo milenar reinventado pelos índios terenas [Internet]. São Paulo (SP): **Revista Eletrônica El País**; 2015 Ago. Disponível em: http://brasil.elpais.com/brasil/2015/08/08/politica/1439065484_035712.html).
- CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil. São Paulo: Paulicéia, p. 11-50, 1994.

CONAB.GOV.BR/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/15911_24c70d975e489a2dba69d5c98c1ca9c7

DEL BIANCHI, V. L. DEL BIANCHI, V. L. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte de Estado de São Paulo. **Balanços de massa e energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo**, 1998.

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.113-125, 2003.

EMBRAPA-mandioca em números,2018 - <https://www.embrapa.br/congresso-de-mandioca-2018/mandioca-em-numeros>.

FERRAZ, et al (2016). Crueira: resíduo agroindustrial sólido rico em amido. **Scientia Plena**. 12. 10.14808/sci.plena.2016.054209.

FERNANDES, M. L. P., SILVA, E. M.; Produção de enzimas extracelulares por *agaricus blazei* e *pleurotus ostreatus* cultivados em casca de arroz suplementado com farelo de milho – **Seminário de Iniciação Científica/ UFT**, Palmas - 2012

FIGUEIREDO, A. da S. Caracterização nutricional e desenvolvimento de produto alimentício adicionado de *Pleurotus albidus*. 2017. 115 f. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

FRUTUOSO, M.A.; MARANA, S.R. "A Single Amino Acid Residue Determines the Ratio of Hydrolysis to Transglycosylation Catalyzed by beta-glucosidases", *Protein & Peptide Letters* (2013) 20: 102. <https://doi.org/10.2174/0929866511307010102>.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.

HOH, Yin Kiong; YEOH, Hock-Hin; TAN, Teck Koon. Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 590-593, 1992.

IBGE - Elaboração: CGEA/DCEE/SPA/MAPA – **Censo agropecuário** (1996/2016).

KIRSCH, L. S.; Produção da biomassa de *Pleurotus albidus* por fermentação submersa para elaboração de barras de cereais - 124 f.: il. **Tese** (doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas. 2013

KIRSCH, L. S.; MACEDO, A. J. P. de; TEIXEIRA, M. F. S. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Manaus, v. 47, n. 1, p.658-659, abr. 2016.

LECHNER, et al. The Genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*. 96. 844-57. 10.2307/3762117. (2004).

LEITE, R. S. R. Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de β -glicosidase produzidas pelos microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*: Aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados. 2007. 83 p. **Tese** (doutorado), UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2007

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, Nova York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

LIMA, Fernando Sanches; KUROZAWA, Louise Emy; IDA, Elza louko. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. **LWT-food science and technology**, v. 59, n. 2, p. 1274-1282, 2014.

MELEIRO, Luana Parras et al. A novel β -glucosidase from *Humicola insolens* with high potential for untreated waste paper conversion to sugars. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 391-408, 2014.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, R. P.; TENDERDY, R. P. Principles of solid state fermentation, in: J. E. SMITH; D. R. BERRY; B. KRISTIANSEN (eds). **The filamentous Fungi**, vol. 4, Fungal Technology, p. 117-144. Arnold, London, 1983.

NEVES, V. J. M.das; Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino. 2004. 55 f. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2004.

NEVES, V. J. M.das; BROETTO, F.; MARCHESE, J. A.; Aproveitamento do resíduo da produção de farinha de mandioca na produção de álcool fino. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2008.

PANDEY, Ashok et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, 2000.

PANDEY, Ashok et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, 2000.

PEREIRA Jr, G.; et al.; BRASIL, E.M.; SHIMODA, E.; Parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui alimentados com rações contendo farinha de crueira de mandioca. **Acta Biomédica Brasiliensia**, Campos dos Goytacazes, v. 4, n. 1, p.2-2, jul. 2013.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico** (INFOTECA-E) - Fortaleza: 2005 <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/426390>

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

QUIROZ-CASTAÑEDA, Rosa Estela; FOLCH-MALLOL, Jorge Luis. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass techniques, applications and commercialization. InTech, p. 119-155, 2013.

SANTOS, R.F., Purificação, caracterização e aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja – 106 f.:il. Londrina, 2010.

SILVA, D. F. Processo integrado de produção de enzimas fibrolíticas, açúcares fermentescíveis e cogumelos comestíveis utilizando resíduos agroindustriais - Rio Claro, 2016. 239 f.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOUZA, Flavio Henrique Moreira de; FURRIEL, Rosa dos Prazeres Melo; WARD, Richard John. Caracterização bioquímica e biofísica das beta-glicosidases de *Humicola insolens*: aplicação na sacarificação da celulose. 2013.

TAGLIARI, P. S. Agroindústria de mandioca: desafios para os pequenos empresários. **Agrop. Catarinense**, Florianópolis, v.9, n.3, p.37-40, set. 1996.

T.C. dos Santos et al.- *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*theobroma cacao*) **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.80, n.1, p.65-71, jan./mar., 2013

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

VIEIRA, R. L. Bioconversão de resíduos lignocelulósicos em proteínas: O cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* – **tese de bacharelado** – Curitiba, PR, 2001.

YUN, Soo-In et al. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

ZAMORA, H. D.Z., Produção simultânea de hemi(celulases) e açúcares redutores por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de *Alstroemeria* sp. UFU – Uberlândia, 94 f.: il., 2017.

ZOLDAN, G; et al. Manual de referencias para casas de farinha. SEBRAE/ AL- **Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Estado de Alagoas**, 2006.