

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE CASCAVEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**FABÍOLA GIOVANNA NESELLO VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -XILOSIDASE POR *Aspergillus fumigatus***

**CASCAVEL - PR**

**2014**

**FABÍOLA GIOVANNA NESELLO VIEIRA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -XILOSIDASE POR *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia G. Simão  
Co-orientador: Prof. Dr. Divair Christ

**CASCADEL - PR**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V658o Vieira, Fabíola Giovanna Nesello  
Otimização da produção de  $\beta$ -xilosidase por *Aspergillus fumigatus*./Fabíola Giovanna Nesello Vieira. Cascavel, 2014.  
31p.

Orientador<sup>a</sup>: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia G. Simão

Coorientador: Prof. Dr. Divair Christ

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1.Planejamento experimental. 2. Resíduo agrícola. 3. Resíduo industrial.  
4. Cevada. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

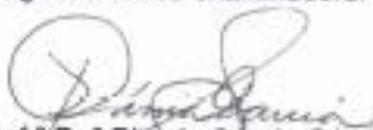
CDD 22.ed. 631

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9<sup>a</sup>/965

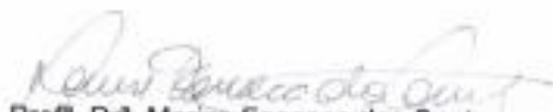
**FABIOLA GIOVANNA NESELLO VIEIRA**

"Otimização da Produção de B-Xilosidade por *Aspergillus fumigatus*"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:



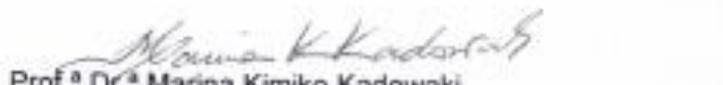
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia García Simão  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marise Fonseca dos Santos  
Colegiado de Medicina Veterinária, UFPR



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Sene  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Kimiko Kadowaki  
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Unioeste

Cascavel, 10 de junho de 2014.

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Fábíola Giovanna Nesello Vieira, natural de Toledo, Paraná, Brasil, nascida no dia 24 de janeiro de 1984, formou-se com grau de licenciatura e bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Paranaense (UNIPAR) em dezembro de 2005. Tornou-se especialista em Auditoria e Gestão Ambiental pela Faculdade Sul Brasil (FASUL) em 2010 e em 2012 ingressou no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em nível de mestrado em Engenharia Agrícola na UNIOESTE (*campus* de Cascavel, PR) no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, na área de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, para desenvolver projeto experimental na linha de pesquisa de Bioquímica, Biotecnologia, Planejamento Experimental e Otimização de processos orientada e co-orientada pelos docentes Rita C. G. Simão e Divair Christ do Programa PGEAGRI, respectivamente.

*“Se eu pude enxergar mais longe  
é porque estava sobre os ombros de gigantes”  
(Isaac Newton)*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos aqueles que sempre confiaram em mim, desde sempre;

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar, que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento;

À Profa. Dra. Rita de Cássia G. Simão, minha orientadora e exemplo profissional, por sempre me apoiar e acreditar no meu desenvolvimento profissional com muita paciência, mostrando novos caminhos e sonhos a serem realizados;

Agradeço pela paciência, o empenho, a boa vontade, os conhecimentos e todo o apoio oferecido pelo Prof. Dr. Divair Christ, que me auxiliou durante todo o processo experimental como um real co-orientador. Sem o seu auxílio, este trabalho não seria executado;

Às amigas de laboratório, Luciana Graciano, Juliana M. Corrêa e Elaine dos Santos, com quem tive o prazer de dividir muitas horas de minha vida e que me transmitiram muitos conhecimentos e experiências práticas, auxiliando sempre em minhas dúvidas, e que se tornaram grande amigas;

Ao Prof. Dr. José Luís da Conceição Silva pela identificação molecular do fungo *Aspergillus fumigatus* (PC-7S-2 M) e à Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki pelo uso de seu isolado fúngico e toda sua infra-estrutura laboratorial;

Agradeço especialmente às docentes Profa. Dra. Sandra L. Balbo e Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur, pelo compartilhamento de equipamentos do laboratório de Fisiologia;

Ao Restaurante e Cervejaria Martignoni Bier de Cascavel, por gentilmente doar o resíduo bagaço de cevada usado nos experimentos realizados neste trabalho;

Ao apoio financeiro fornecido pela CAPES pela concessão da minha bolsa de mestrado e apoio ao meu projeto de pesquisa através de PROAP; ao CNPQ/MCT, que financiou o projeto SISBIOTA do qual o meu projeto foi um sub-projeto; à Fundação Araucária, que financiou a Professora Rita parcialmente através de bolsa produtividade em pesquisa; à UNIOESTE e aos funcionários e docentes do PGEAGRI pelo apoio, empréstimo de equipamentos e a formação acadêmica.

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -XILOSIDASE POR *Aspergillus fumigatus*

**RESUMO** A biomassa lignocelulósica abundante nos resíduos agroindustriais, pode ser reutilizada como substrato barato para induzir a produção de enzimas, como  $\beta$ -Xilosidases. O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de  $\beta$ -Xilosidase de *Aspergillus fumigatus* (PC-7S-2 M), isolado da Mata Atlântica do Parque Estadual Cabeça do Cachorro (Paraná, Brasil) e posteriormente identificado por métodos morfológicos e moleculares (ITS). O fungo mesofílico foi cultivado à temperatura de 28 °C em meios líquidos de cultura Czapeck, contendo 1% de diferentes resíduos agroindustriais (w/v): casca de maracujá, casca de pokan, bagaço de cevada, flocos de soja e casca de banana madura. Inóculos de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> foram incubados durante 7 dias, filtrados e submetidos a dosagem de  $\beta$ -Xilosidase intracelular, obtendo-se um valor máximo de 15 U ml<sup>-1</sup> para a enzima na presença de bagaço de cevada com 4 dias de cultivo. Assim, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimizar a produção de  $\beta$ -Xilosidase, usando o bagaço de cevada como fonte de carbono em um nível de significância  $p < 0,10$ , o qual gerou um modelo predito de 245,04 U ml<sup>-1</sup>. A validação do modelo forneceu um resultado otimizado médio igual a 229,06 U ml<sup>-1</sup> para a enzima. Assim, a produção de  $\beta$ -Xilosidase aumentou em 1.500% em relação à obtida inicialmente para o fungo *A. fumigatus* na presença de bagaço de cevada como fonte de carbono (15 U ml<sup>-1</sup>), permitindo, deste modo, alcançar 93,47 % do modelo predito. Este achado ressalta a viabilidade de produção de  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* com possíveis aplicações em vários processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** bagaço de cevada; planejamento experimental; resíduo agroindustrial; hemicelulose;  $\beta$ -xilosidase, *Aspergillus fumigatus*

## OPTIMIZATION OF $\beta$ -XYLOSIDASE PRODUCTION BY *Aspergillus fumigatus*

**ABSTRACT** The abundant lignocellulosic biomass in agro-industrial waste can be reused as an inexpensive substrate for inducing the production of enzymes such as  $\beta$ -xylosidases. The purpose of this study was to analyze the production of  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus fumigatus* (PC-7S-2 M), isolated from the Atlantic Forest of the Dog Head State Park (Paraná, Brazil) and later identified by morphological and molecular (ITS) methods. The mesophilic fungus was grown at 28 °C in liquid culture media containing Czapeck and 1% of different agroindustrial residues (w/v): passion fruit peel, Ponkan peel, barley brewing residue, soy flakes and ripe banana peel. Inoculants of  $10^5$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  were incubated for 7 days, filtered and assayed for  $\beta$ -xylosidase intracellular activity obtaining a maximum value of 15 U  $\text{ml}^{-1}$  of the enzyme in the presence of barley brewing residue after 4 days of cultivation. Then, it was used a Central Composite Rotational Design (CCRD) to optimize the production of  $\beta$ -xylosidase, using barley brewing residue as carbon source at a significance level of  $p < 0.10$  which generated a predicted model of 245.04 U  $\text{ml}^{-1}$ . Model validation provided an average optimized result equal to 229.06 U  $\text{ml}^{-1}$  for the enzyme. Thus, the production of  $\beta$ -xylosidase increased in 1,500% over the initially obtained for *A. fumigatus* in the presence of the barley brewing residue, therefore, achieving 93.47% of the predicted model. This finding emphasizes the availability of *A. fumigatus*  $\beta$ -xylosidase production with possible applications in several biotechnological process.

**Keywords:** barley brewing residue; experimental design; agroindustrial residue; hemicellulose;  $\beta$ -Xylosidase, *Aspergillus fumigatus*.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
<b>Artigo</b> – Otimização da produção de $\beta$ -xilosidase em <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	01
CONCLUSÕES.....	27
AGRADECIMENTOS.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
LEGENDAS DAS FIGURAS.....	31

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Níveis utilizados para três fatores estudados no DCC (Delineamento Composto Central).

**Tabela 2** Matriz do delineamento composto central (DCC) com valores codificados e valores reais dos fatores de estudo (concentração de resíduo, temperatura e concentração de extrato de levedura).

**Tabela 3** Resultados obtidos para o caminho da máxima inclinação.

**Tabela 4** Níveis dos fatores utilizados no segundo planejamento experimental denominado Delineamento Central Rotacional com Repetição do Ponto Central (DCCR).

**Tabela 5** Matriz do delineamento (DCCR) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (concentração de resíduo, temperatura e concentração de extrato de levedura).

**Tabela 6** Resumo da ANOVA do modelo matemático de 1ª ordem para  $\beta$ -xilosidase.

**Tabela 7** Matriz do planejamento  $2^3$  com níveis dos fatores e produção de  $\beta$ -xilosidase

**Tabela 8** Resumo da ANOVA do modelo matemático de 2ª ordem para a produção de  $\beta$ -xilosidase

## LISTA DE FIGURAS

### Legendas das figuras

**Fig. 1 (a)** Atividade de  $\beta$ -xilosidase intracelular de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) após 10 dias de cultivo a 28 °C em 25 mL de meio Czapeck líquido modificado sob agitação (120 rpm) (colunas negras) e no mesmo meio mantido em estado estacionário (colunas brancas), usando como fonte de carbono diferentes resíduos provenientes da agroindústria na concentração final de 1% (w/v). **(b)** Dosagem de  $\beta$ -xilosidase intracelular de micélios de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) crescidos em cultivo líquido estacionário durante 7 dias, usando o resíduo bagaço de cevada 1% (w/v) como fonte de carbono. Os experimentos foram feitos em duplicata e as dosagens em triplicata. Assim, as barras de erro representam as médias de três resultados independentes.

**Fig. 2** Comparação dos resultados dos efeitos lineares para a produção de  $\beta$ -xilosidase (valores absolutos)

**Fig. 3 (a)** Superfícies de resposta quanto a produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e temperatura, **(b)** do extrato de levedura e bagaço de cevada e **(c)** da temperatura e extrato de levedura, sem os pontos axiais.

**Fig. 4** Resultados da produção da atividade de  $\beta$ -xilosidase em 8 condições diferentes de bagaço de cevada e extrato de levedura

**Fig. 5** Superfícies de resposta quanto à produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e temperatura (a), do extrato de levedura e bagaço de cevada (b) e da temperatura e extrato de levedura (c)

**Fig. 6** Condições ótimas e desejáveis para a produção de  $\beta$ -xilosidase

**ARTIGO****OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -XILOSIDASE POR *Aspergillus fumigatus***

A formatação geral do presente texto, figuras, legendas, tabelas, citações e referências bibliográficas do artigo estão de acordo com as instruções do periódico *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (ISSN:1367-5435), ao qual foi submetido, com exceção de estar na Língua Portuguesa, uma exigência estabelecida pela Resolução Normativa da Universidade Estadual do Oeste do Paraná nº 318/2011-CEPE, de 15 de dezembro de 2011.

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -XILOSIDASE POR *Aspergillus fumigatus***

Fabíola Giovanna Nesello Vieira<sup>1</sup>, Divair Christ<sup>1</sup>, Rita de Cássia Garcia Simão<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. <sup>2</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

\*Autor para correspondência

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas

Rua Universitária, 2069 - Cascavel, PR, 85819-110, Brasil

e-mail: rita.simao@unioeste.br ou ritabioq@yahoo.com.br

Tel: (+55) 45 3220 3292 Fax: (+55) 45 3220 3280

## RESUMO

A biomassa lignocelulósica abundante nos resíduos agroindustriais pode ser utilizada como substrato barato para induzir a produção de enzimas como  $\beta$ -Xilosidases. O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de  $\beta$ -Xilosidase de *Aspergillus fumigatus* (PC-7S-2 M), isolado da Mata Atlântica do Parque Estadual Cabeça do Cachorro, Paraná, Brasil e posteriormente identificado por métodos morfológicos e moleculares (ITS). O fungo mesofílico foi cultivado à temperatura de 28 °C em meio líquido de cultura Czapeck contendo diferentes resíduos agroindustriais a 1% (w/v): casca de maracujá, casca de pokan, bagaço de cevada, flocos de soja e casca de banana madura. Suspensão de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> foram incubados durante 7 dias, filtrados e submetidos à dosagem de  $\beta$ -Xilosidase intracelular, obtendo-se um valor máximo de 15 U mL<sup>-1</sup> para a enzima na presença de bagaço de cevada com 4 dias de cultivo. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar a produção de  $\beta$ -Xilosidase, suplementado com bagaço de cevada como fonte de carbono em um nível de significância  $p < 0,10$  o qual gerou um modelo predito de 245,04 U mL<sup>-1</sup>. A validação do modelo forneceu um resultado otimizado de 229,06 U mL<sup>-1</sup> para a enzima. Assim, a produção de  $\beta$ -Xilosidase aumentou em 1.500% em relação à obtida inicialmente para o fungo *A. fumigatus*, na presença de bagaço de cevada como fonte de carbono, permitindo, deste modo, alcançar 93,47 % do modelo predito. Este achado ressalta a viabilidade de produção de  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* com possíveis aplicações em vários processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** bagaço de cevada; planejamento experimental; resíduo agroindustrial; hemicelulose;  $\beta$ -Xilosidase, *Aspergillus fumigatus*

## Introdução

A molécula do xilano, um dos componentes da hemicelulose da parede celular das plantas que estão presente nos resíduos agroindustriais, é degradada por endo-Xilanases (E.C. 3.2.1.8) [1] a xilooligosacarídeos que servem como substratos para as enzimas  $\beta$ -Xilosidases (E.C. 3.2.1.37) **que também** se caracterizam por degradar o dissacarídeo xilobiose a xilose, incluindo enzimas monofuncionais e multifuncionais [2]. As  $\beta$ -Xilosidases são muito utilizadas em diferentes abordagens moleculares e podem ser aplicadas em processos industriais para degradação de polímeros devido à hidrólise total do xilano, podendo também ser de grande aplicabilidade em novas tecnologias em indústrias alimentícias, de ração, de produção de bioetanol e têxtil [3].

Os fungos são capazes de degradar contaminantes de solo e água em baixas concentrações, sendo degradadores em potencial na ausência de nutrientes, principalmente quando se trata em relação às condições de nitrogênio encontradas em locais poluídos, desta forma estimulando a produção de sistemas enzimáticos variados [4]. Também são capazes de assimilarem substâncias orgânicas como fonte de energia e de carbono, essas encontradas em efluentes de indústrias, mostrando para seu estudo e no desenvolvimento de novos estudos, verificando a capacidade de produção de enzimas desses fungos degradadores de resíduos, como palha de milho, casca de arroz, fibra de coco, bagaço de cevada, entre outros gerados em abundância. Assim, faz-se necessário o investimento de processos inovadores para obtenção de enzimas utilizando este grupo de microorganismos [4, 5].

Espécies de *Aspergillus* vêm sendo muito estudadas em função da sua vasta distribuição por diferentes regiões, por serem um grande degradador de contaminantes do solo, produzirem altos níveis de proteínas extracelulares, apresentarem uma manutenção viável economicamente [6] e apresentarem propriedades genéticas bem caracterizadas, além da disponibilidade de várias cepas mutantes. A aplicação destes em tratamento de efluentes, por exemplo, em indústrias têxteis é de grande interesse, como também a utilização para degradação de resíduos agroindustriais [7].

O fungo *Aspergillus fumigatus*, especificamente, é utilizado em diferentes processos Biotecnológicos, como a produção de antibióticos, a produção de enzimas e para a biodegradação de compostos tóxicos do ambiente, como os corantes da indústria têxtil, representando, assim, uma alternativa no tratamento de efluentes e na obtenção de vários subprodutos. O microrganismo apresenta esporos assexuados e é caracterizado por ser saprófito e mesofílico, sendo encontrado em diferentes ambientes, como, por exemplo, aéreos, terrestres e em ecossistemas marinhos, além de se desenvolverem bem em temperaturas entre 28 e 40 °C [8].

A aplicação de planejamento experimental em um processo é uma ferramenta para otimizar produtos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimentos, produtividade e qualidade. Essa ferramenta é fundamentada na teoria estatística, em que o planejamento consiste em determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas [9].

No presente trabalho, objetivamos analisar e otimizar a produção de  $\beta$ -Xilosidase intracelular de um isolado fúngico da espécie *Aspergillus fumigatus*(PC-7S-2 M), coletado especificamente da Mata Atlântica da região oeste do Paraná, Brasil, uma região de proteção ambiental denominada Parque Estadual Cabeça do Cachorro, uma biodiversidade de microrganismos inexplorada e não catalogada até o momento. A produção da  $\beta$ -Xilosidase foi analisada utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono para crescimento fúngico e analisando as melhores condições para a indução da atividade de  $\beta$ -Xilosidase. Para isto, foi aplicada a técnica de abordagem estatística de planejamento experimental para maximizar a otimização da produção e indução das atividades enzimáticas usando diferentes combinações.

## Materiais e métodos

### Características do ponto de coleta

O fungo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) foi isolado durante coletas realizadas no Parque Estadual Cabeça do Cachorro, São Pedro do Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. O Parque possui uma área total de 60,98 hectares, inserido na mesorregião do oeste do Paraná, na microrregião de Toledo, incluindo a porção centro-sul do município de São Pedro do Iguaçu, sob as coordenadas 24° 54' 47'' de latitude (sul) e 53° 54' 35'' de longitude (oeste). O Parque localiza-se às margens do Rio Corvo Branco, também denominado de São Francisco Falso Braço Norte, pertencente à Bacia Hidrográfica do Rio Paraná III. A unidade de Conservação recebe este nome pois, através da visualização de fotos aéreas e de imagens de satélite da área que a compreende, é possível visualizar o formato similar a uma cabeça de cachorro. O Parque ainda apresenta um clima subtropical, caracterizado por verões quentes, com geadas não muito frequentes e com tendências de concentração das chuvas nos meses de verão. A formação da vegetação do Parque Estadual Cabeça do Cachorro é de Floresta Estacional Semidecidual Submontana (FESS) e seu entorno é composto por floresta e áreas predominantemente agrícolas, podendo ser considerada um importante remanescente da formação para toda a região oeste do Paraná [10].

### Coleta, identificação e manutenção da culturas

O microrganismo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) foi identificado primeiramente por aspectos morfológicos por taxonomistas da Universidade Federal de Pernambuco. A confirmação da identificação do isolado em nível de gênero e espécie foi realizada por análise da sequência nucleotídica da região ITS do DNA correspondente ao rRNA do microrganismo. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Bioquímica Molecular da UNIOESTE através da extração do DNA total do fungo, seguido de replicação do amplicon alvo usando oligonucleotídeos específicos. Os amplicons obtidos foram sequenciados pela empresa HELIXXA e a sequência obtida foi analisada com ferramentas de alinhamento de sequências (Blast-x) de acesso e domínio público (NCBI-National Center for Biotechnology Information).

Os conídeos do *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) foram mantidos em tubos contendo 5 ml de meio sólido ágar-batata-dextrose (BDA) composto por glicose 1,5%, agar-agar 2,0% e caldo de batata 20%, estes foram cultivados e crescidos à temperatura de 28 °C durante 7 dias. Após seu crescimento, o microrganismo foi mantido e armazenado a 4 °C por até 30 dias. Embora o isolado pertença à micoteca ao laboratório de Bioquímica da UNIOESTE, este é também depositado na micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

### Preparo dos subprodutos e resíduos da agroindústria

As fontes de carbono testadas nos ensaios para crescimento do fungo e indução da atividade enzimática foram selecionadas ao acaso e incluíram: bagaço de cevada, farelo de trigo, casca de maracujá, casca de pokan e casca de banana madura. Os resíduos usados nos ensaios foram preparados com secagem inicial em estufa a 70 °C, por 24 horas, seguido de trituração em moinho (moinho de facas SL30 – SOLOLAB) com a utilização da peneira. Os resíduos triturados foram peneirados em quatro peneiras variando de 12 a 48 mesh, e posteriormente armazenados em frascos de vidro transparente à temperatura ambiente.

### Condições de cultivo do *A. fumigatus*(PC-7S-2 M)

Os conídeos do fungo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) foram mantidos em meio BDA a 4 °C e após estado fresco foram utilizados para preparar 1 ml suspensão ( $1 \times 10^5$  conídeos  $\text{ml}^{-1}$ ) em água destilada estéril e inoculados em 25 ml do meio mineral Czapeck modificado ( $\text{NaNO}_3$  0,3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g; KCl 0,05 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 g; caseína 0,1 mg em pH 6.0) e suplementados com 1% (w/v) dos diferentes resíduos agroindustriais colocados separadamente, tais como casca de maracujá, casca de pokan, bagaço de cevada, flocos de soja e casca de banana madura. Os cultivos foram realizados de duas formas: líquido estacionário e líquido agitado e mantidos a 28 °C por 10 dias em duplicatas. Após este período, os cultivos foram filtrados à vácuo em papel Whatman estéril; o micélio obtido foi congelado, macerado na proporção de 1:1 com 1g de areia tratada e ressuspensos com 5 ml de água destilada, centrifugados a 4 °C, 8.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para dosagens de  $\beta$ -Xilosidase e determinação do pH ótimo e temperatura ótima.

### Dosagem da atividade de $\beta$ -Xilosidase

Em 50  $\mu\text{l}$  de extrato enzimático foi adicionado 250  $\mu\text{l}$  do substrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (*p*NPX) (Sigma-Aldrich®) e incubados em banho-maria à temperatura de 50 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida por adição de 1 ml de solução saturada de tetraborato de sódio, a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro em 410 nm (Metrolab 1700 – UV-VIS-Spectrophotometer). Os valores de leitura foram calculados através da fórmula obtida através da curva de calibração feita com *p*-Nitrofenol 1mg/ml, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{moles/ml}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como aquela capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-Nitrofenol por mililitro de reação [11].

### Influência do tempo na produção de $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus*

Após o desenvolvimento do fungo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) em meio de cultivo Czapeck modificado contendo os diferentes resíduos testados, selecionou-se a melhor fonte de carbono para a produção de  $\beta$ -Xilosidase. Além disso, também foi padronizado o cultivo líquido estacionário, como o mais eficiente para a produção da enzima. Assim, o fungo foi inoculado em cultivo líquido estacionário na presença do resíduo que operou como melhor indutor de atividade  $\beta$ -Xilosidásica por um período de 7 dias e a cada dia foram retirados dois frascos com as amostras, feita a filtração do cultivo e a preparação das amostras para a realização de testes enzimáticos. Analisou-se a dosagem de  $\beta$ -Xilosidase intracelular, e análise do melhor dia de produção da proteína estudada. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e as dosagens em triplicata.

### Influência do pH e temperatura na atividade de $\beta$ -Xilosidásica intracelular de *A. fumigatus*.

A dosagem enzimática de  $\beta$ -Xilosidase também foi analisada quanto às variações em diferentes pH, utilizando solução de tampão McIlvaine [12] em uma faixa de pH entre 5 a 7,5. Para análise do efeito da temperatura na atividade da enzima em extrato bruto, foram incubadas amostras em uma faixa de temperatura de 35 a 60 °C, variando em uma escala de 5 graus. A reação enzimática foi feita conforme as condições ótimas de ensaio. Os experimentos foram realizados em duplicata e as dosagens em triplicata.

### Planejamento experimental

A partir dos experimentos realizados, foi possível obter as condições ideais para produção de  $\beta$ -Xilosidase intracelular do fungo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M). Assim, determinou-se as variáveis que exerceram maior influência no desempenho do fungo em produzir a enzima  $\beta$ -Xilosidase, possibilitando redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos, redução do tempo do processo, redução do custo operacional, melhoria no rendimento do processo e aproveitamento de resíduo industrial, que atualmente é produzido em grande quantidade.

O planejamento experimental fatorial do tipo DCCR (delineamento central rotacional com repetição do ponto central) foi realizado para determinar as condições otimizadas de produção de  $\beta$ -Xilosidases do isolado fúngico a partir do resíduo selecionado, bagaço de cevada [13]. A combinação das variáveis foi determinada com dois níveis, três fatores, adição de seis pontos axiais e repetição do ponto central, totalizando 17 amostras. Foram calculados os efeitos principais das variáveis e suas interações e a Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 10%. O planejamento experimental

DCCR e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para otimizar as condições e fornecer um modelo matemático adequado especificamente para a atividade de  $\beta$ -Xilosidase neste processo [14], objetivando-se maximizar a produção da enzima e facilitando progressivamente a seleção de variáveis como: condições de temperatura, dias de incubação, possibilidade de agitação ou não e, principalmente, a concentração do resíduo para maior produção da enzima desejada.

#### 1º Planejamento experimental - Delineamento composto central (DCC)

O delineamento composto central foi caracterizado por um experimento com um ponto central e executado em duplicatas, dando a estimativa do erro puro e dois níveis dos fatores e pontos axiais, que determinaram os termos quadráticos [15]. Este delineamento foi ajustado às condições de trabalho do laboratório de modo a obterem-se os efeitos principais dos fatores estudados. Na Tabela 1 são apresentados os níveis usados em cada fator estudado. Os valores codificados para os fatores analisados. Os valores reais para os mesmos estão apresentados na Tabela 2, onde realizou-se 11 ensaios com diferentes combinações. A análise estatística foi realizada de modo a obter os efeitos lineares e um modelo foi ajustado de acordo com a Equação 1, abaixo, para descrever a superfície de resposta.

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^3 \hat{a}_i b_i X_i + \sum_{i,j=1}^3 \hat{a}_{ij} b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

#### Caminho da Máxima Inclinação

A partir dos resultados do primeiro planejamento, elaborou-se 8 combinações para encontrar-se os pontos ótimos dos fatores usando-se o resíduo bagaço de cevada e a fonte de nitrogênio extrato de levedura. Uma vez que isolamos um microrganismo de caráter mesófilo, a temperatura do experimento foi fixada em 28 °C, como mostrado na Tabela 3, a fim de aproximar as estratégias experimentais buscando determinar aqueles que otimizariam as variáveis dependentes ou respostas. O ensaio que apresentou melhor resposta para produção de  $\beta$ -Xilosidase foi selecionado como ponto central do segundo planejamento, quando foi elaborado o delineamento composto central rotacional (DCCR). Os ensaios com as combinações descritas foram usados para estabelecer a relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes, pois estas ainda não são conhecidas e precisam de aproximação, permitindo, assim, a análise dos dados, se esses estão distantes dos pontos ótimos. De fato, tais ensaios foram realizados como objetivo pontual de possibilitar a aproximação dos pontos e, finalmente, a seleção do ponto ótimo [16].

**Tabela 1** Níveis utilizados no DCC para três fatores estudados

Fatores	-1	0	+1
Bagaço de cevada (g)	0,125	0,250	0,375
Temperatura (°C)	28	35	42
Extrato de levedura (g)	0,025	0,052	0,080

**Tabela 2** Matriz do delineamento composto central (DCC) com valores codificados e reais dos fatores de estudo (concentração de resíduo, temperatura e concentração de extrato de levedura)

Ensaio*	Valores codificados			Valores reais				
	Bagaço de cevada	°C	Extrato de levedura	Bagaço de cevada (g)	%	°C	Extrato de levedura (g)	%
1	-1	-1	-1	0,125	0,5	28	0,025	0,10
2	1	-1	-1	0,375	1,5	28	0,025	0,10
3	-1	1	-1	0,125	0,5	42	0,025	0,10
4	1	1	-1	0,375	1,5	42	0,025	0,10
5	-1	-1	1	0,125	0,5	28	0,080	0,32
6	1	-1	1	0,375	1,5	28	0,080	0,32
7	-1	1	1	0,125	0,5	42	0,080	0,32
8	1	1	1	0,375	1,5	42	0,080	0,32
9	0	0	0	0,250	1,0	35	0,052	0,20
10	0	0	0	0,250	1,0	35	0,052	0,20
11	0	0	0	0,250	1,0	35	0,052	0,20

\* Ordem dos ensaios realizados aleatoriamente

**Tabela 3** Caminho da máxima inclinação

Ensaio	Bagaço de cevada (g)	%	Extrato de Levedura (g)	%
1	0,375	1,5	0,064	0,25
2	0,500	2,0	0,075	0,30
3	0,625	2,5	0,086	0,34
4	0,750	3,0	0,097	0,38
5	0,825	3,5	0,108	0,43
6	1,000	4,0	0,119	0,47
7	1,120	4,5	0,130	0,52
8	1,250	5,0	0,141	0,56

## 2º Planejamento experimental - Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O delineamento baseou-se em três fatores, sendo eles: concentração do resíduo (bagaço de cevada) como fonte de carbono; temperatura e concentração do extrato de levedura (fonte de nitrogênio). As condições de crescimento do microrganismo foram: cultivo de 4 dias em estado líquido estacionário a 28 °C

A matriz experimental  $2^3$  foi composta por três pontos centrais e seis pontos axiais, onde os dois níveis combinados com três fatores totalizaram 17 ensaios. Selecionou-se a combinação de 0,750 g de bagaço de cevada com 0,097 g de extrato de levedura como ponto central, pois foi o ensaio que apresentou maior produção de  $\beta$ -Xilosidase dentre as combinações, apresentados na Tabela 3. Na Tabela 4 estão mostrados os níveis dos fatores do segundo planejamento. Na Tabela 5 são apresentados os valores codificados e os valores reais do planejamento realizado com os três pontos centrais e os seis pontos axiais, totalizando os 17 ensaios realizados.

### Otimização de processos

A otimização consiste em identificar o ajuste que melhor atende simultaneamente o conjunto de variáveis de resposta [16]. O ajuste ótimo corresponde ao ajuste que minimiza a função de perda quadrática multivariada, ou seja, o ajuste ótimo é aquele que incorre na menor perda global de todos os fatores relacionados. Desta forma, para a validação do processo foi realizada a preparação de 6 amostras iguais, nas condições ótimas definidas pelo planejamento experimental, conforme Tabela 5.

### Validação do modelo

A análise estatística foi realizada de maneira a determinar quais eram os coeficientes significativos e ajustar um modelo de segunda ordem (Equação 2) para correlacionar as variáveis e suas respostas, ( $p < 0,1$ ).

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1}^3 b_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 2})$$

Os coeficientes significativos do modelo foram avaliados por meio do teste “t” onde  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$  são os coeficientes da regressão do modelo, e  $X_i$  e  $X_j$  são as variáveis independentes, em valores codificados.

**Tabela 4** Níveis dos fatores utilizados no segundo planejamento (DCCR)

Fatores	-1,68	-1	0	1	+1,68
Bagaço de cevada (g)	0,515	0,600	0,725	0,850	0,935
Temperatura (°C)	22	24	28	32	35
Extrato de levedura (g)	0,074	0,085	0,097	0,115	0,125

**Tabela 5** Matriz do delineamento (DCCR) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (concentração de resíduo, temperatura e concentração de extrato de levedura)

Ensaio*	Valores codificados			Valores reais				
	Bagaço de cevada	°C	Extrato de levedura	Bagaço de cevada (g)	%	°C	Extrato de levedura (g)	%
1	-1	-1	-1	0,600	2,4	24	0,085	0,3
2	1	-1	-1	0,850	3,4	24	0,085	0,3
3	-1	1	-1	0,600	2,4	32	0,085	0,3
4	1	1	-1	0,850	3,4	32	0,085	0,3
5	-1	-1	1	0,600	2,4	24	0,115	0,5
6	1	-1	1	0,850	3,4	24	0,115	0,5
7	-1	1	1	0,600	2,4	32	0,115	0,5
8	1	1	1	0,850	3,4	32	0,115	0,5
9	0	0	0	0,725	2,9	28	0,097	0,4
10	0	0	0	0,725	2,9	28	0,097	0,4
11	0	0	0	0,725	2,9	28	0,097	0,4
12	-1,68	0	0	0,515	2,1	28	0,097	0,4
13	+1,68	0	0	0,935	3,7	28	0,097	0,4
14	0	-1,68	0	0,725	2,9	22	0,097	0,4
15	0	+1,68	0	0,725	2,9	35	0,097	0,4
16	0	0	-1,68	0,725	2,9	28	0,074	0,3
17	0	0	+1,68	0,725	2,9	28	0,125	0,5

\* Ordem dos ensaios realizados aleatoriamente

## Resultados e Discussão

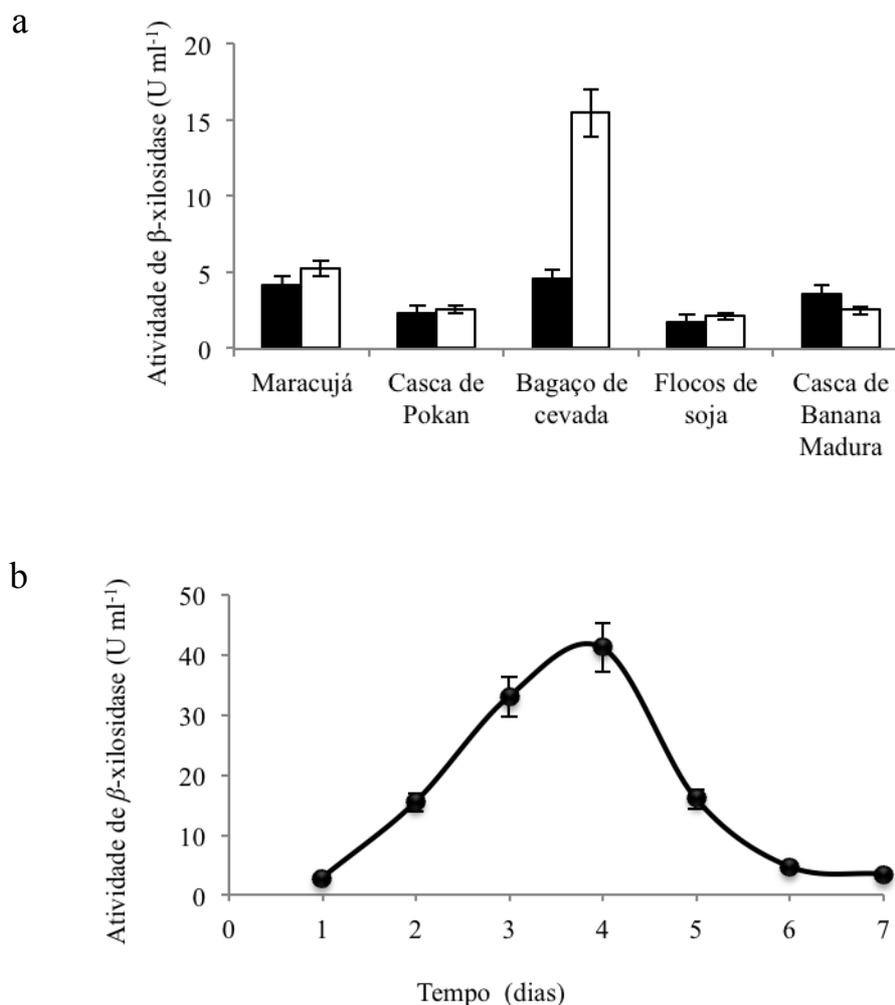
Na Figura 1a estão apresentados os resultados da influência de diferentes concentrações dos resíduos e subprodutos da agroindústria na produção de  $\beta$ -Xilosidases pelo isolado fúngico *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) quando incubado durante 10 dias sob agitação constante ou em estado líquido estacionário a 28 °C. O resíduo bagaço de cevada foi o mais eficiente para a produção de  $\beta$ -Xilosidase sob agitação quando comparado com outras fontes de carbono utilizadas. Entretanto, as diferenças entre os resíduos nestas condições foram muito acanhadas. Por outro lado, este mesmo resíduo da indústria cervejeira foi muito eficiente em induzir uma melhor produção de  $\beta$ -Xilosidase entre as diferentes fontes de carbono testadas na condição de cultivo líquido estacionário, fornecendo um máximo de 15,45 U/ml de atividade enzimática.

De acordo com Michelin et al. [17], em experimentos realizados para indução da atividade de  $\beta$ -Xilosidase dos fungos *A. terricola* e *A. ochraceus*, os autores obtiveram 30 U ml<sup>-1</sup> e 56 U ml<sup>-1</sup> respectivamente, de atividade enzimática na presença de um outro resíduo agroindustrial muito abundante no América do Norte, o sabugo de milho. Assim, a indução da atividade de  $\beta$ -Xilosidase por resíduos ricos em materiais lignocelulósicos em espécies do gênero *Aspergillus* tem sido relatada na literatura. Entretanto, segundo nosso conhecimento, é a primeira vez que o bagaço de cevada é usado para indução de uma  $\beta$ -Xilosidase intracelular de uma espécie do gênero *Aspergillus*.

### Influência do tempo na produção de $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus*

Os níveis de  $\beta$ -Xilosidase produzidos pelo fungo *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) durante a incubação na presença de bagaço de cevada a 1% (w/v) a 28 °C em cultivo líquido estacionário foram mais que 2,5 vezes superiores (41,20 U ml<sup>-1</sup>) no quarto dia de cultivo líquido estacionário a uma temperatura de 28 °C do que o verificado anteriormente após 10 dias, evidenciando uma influência positiva do menor tempo de incubação na atividade da enzima (Fig. 1b).

De acordo com Benassi et al. [18], *A. phoenicis* com os resíduos: flocos de milho, farinha de mandioca e flocos de centeio resultou na produção de  $\beta$ -Xilosidase de 0,36 U ml<sup>-1</sup>, 0,66 U ml<sup>-1</sup> e 7,60 U ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Isso representa valores bem abaixo dos obtidos pelos experimentos não otimizados que apresentamos na Fig. 1a e b. Segundo nosso conhecimento, esse trabalho também é o primeiro registro na literatura envolvendo o bagaço de cevada como uma variável para a otimização da produção de  $\beta$ -Xilosidase em uma espécie de *Aspergillus*.



**Fig. 1 (a)** Atividade de  $\beta$ -xilosidase intracelular de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) após 10 dias de cultivo a 28 °C em 25 mL de meio Czapeck líquido modificado sob agitação (120 rpm) (colunas negras) e no mesmo meio mantido em estado estacionário (colunas brancas), usando como fonte de carbono diferentes resíduos provenientes da agroindústria na concentração final de 1% (w/v). **(b)** Dosagem de  $\beta$ -xilosidase intracelular de micélios de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) crescidos em cultivo líquido estacionário durante 7 dias usando o resíduo bagaço de cevada 1% (w/v) como fonte de carbono. Os experimentos foram feitos em duplicata e as dosagens em triplicata. Assim, as barras de erro representam as médias de três resultados independentes.

O efeito do pH e da temperatura também foi analisado para a atividade enzimática de  $\beta$ -Xilosidase intracelular utilizando-se o extrato bruto da enzima obtido nos cultivos de 4 dias em estado líquido estacionário na presença de bagaço de cevada a 1% (w/v) a 28 °C. Nestes experimentos, foram analisadas as variações da atividade enzimática nos valores de pH, utilizando solução tampão McIlvaine [12] em uma faixa de pH entre 5 e 7,5 e, para o efeito da temperatura na atividade da enzima  $\beta$ -Xilosidase, foram incubadas amostras em uma faixa de temperatura de 35 a 60 °C (escala de 5 graus) com o substrato sintético pNPX, como descrito em Materiais e Métodos. Nossos dados mostraram que após 4 dias de cultivo nas condições mencionadas acima, a  $\beta$ -Xilosidase e *A. fumigatus* apresentou uma atividade ótima em pH 5,5 e uma temperatura ótima a 45 °C.

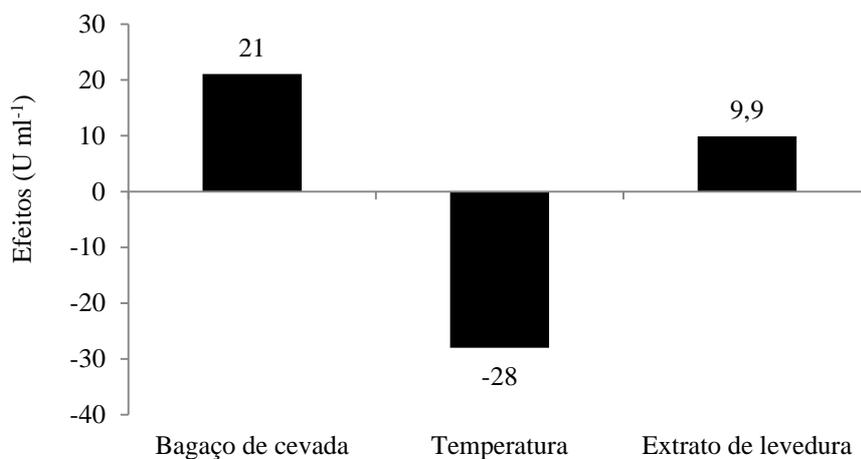
De acordo com Omardien [19], em experimentos realizados para análise da atividade de  $\beta$ -Xilosidase com *Aerobasidium pullulans* (isolado 23B25), foram testados vários resíduos como farelo de trigo e mistura de farelo de trigo com centeio, e a atividade enzimática obtida foi de 0,22 U ml<sup>-1</sup> em 5 dias de crescimento na mistura de farelo de trigo com centeio, apresentando pH ótimo 3 e temperatura ótima entre 80 e 90 °C. Entretanto, comparando os dados obtidos no presente trabalho com os de Omardien, obteve-se uma maior produção de  $\beta$ -Xilosidase (41,20 U ml<sup>-1</sup>) com bagaço de cevada em apenas 4 dias, sendo o pH ótimo 5,5 e a temperatura ótima 45 °C (dados não mostrados). Knob e Carmona [20], em estudo realizado para indução de  $\beta$ -Xilosidase pelo fungo *Penicillium sclerotiorum* em meio suplementado com resíduos, realizaram 5 dias de cultivo à temperatura de 28 °C sob agitação e obtiveram uma produção enzimática de 1,47 U ml<sup>-1</sup> na presença de farelo de trigo, 0,24 U ml<sup>-1</sup>, 0,05 usando farelo de aveia, e 0,01 aplicando espigas de milho com pectina cítrica como fonte de carbono. Nestes ensaios, a atividade ótima foi na temperatura de 60 °C e o pH ótimo, 2,5.

#### 1º Planejamento experimental - Delineamento composto central (DCC)

O coeficiente de correlação linear é observado no intervalo de variação entre os níveis -1 e +1, permitindo quantificar e verificar o sentido do relacionamento, onde valores extremos -1 e +1 referem-se respectivamente às correlações lineares perfeitas, respectivamente, negativa e positiva. Quando os coeficientes assumem valores intermediários, indicam relacionamentos fortes ou fracos, sendo esses mais próximos ou não de valores extremos, quando são próximos ou iguais a zero, indicam ausência de correlação linear [9]. Assim, após estabelecido o melhor meio de cultivo, investigou-se, por meio de um DCC, os efeitos lineares. A temperatura teve um efeito negativo, indicando que ao aumentar a temperatura de cultivo de 28 (-1) para 42 °C (+1) ocorreu uma diminuição da produção de  $\beta$ -Xilosidase em 28 U ml<sup>-1</sup> pelo fungo *A. fumigatus* (Figura 2). Em contrapartida, o bagaço de cevada apresentou um efeito positivo de

21U ml<sup>-1</sup> quando foi adicionado em maior quantidade, uma mudança de 0,125 g (-1) para 0,375 g (+1). O extrato de levedura apresentou um aumento de 9,9 U ml<sup>-1</sup> de produção de  $\beta$ -Xilosidase quando a concentração foi elevada de 0,025 g (-1) para 0,080 g (+1). Observa-se, assim, que a adição de extrato de levedura influenciou a produção da enzima, sendo importante fonte de nitrogênio e outros nutrientes adicionados ao meio de cultivo, porém quando adicionada em quantidade elevada, estatisticamente é possível observar que esta inibe a produção da enzima  $\beta$ -Xilosidase, sendo necessário estabelecer quantidades ótimas para obter níveis ideais da enzima quando combinada com bagaço de cevada.

Utilizando como fonte de nitrogênio o extrato de levedura, Vaithanomsat e colaboradores [21] otimizaram as condições de fermentação usando *A. niger* para produção de  $\beta$ -glicosidase usando a metodologia de superfície de resposta em meio constituído em 0,275 % de extrato de levedura, 1.125 % de celobiose e 2,6 % de sulfato de amônio, com um valor de pH 3, resultando em uma atividade específica de 8,99 U mg<sup>-1</sup>.



**Fig. 2** Comparação dos resultados dos efeitos lineares para a produção de  $\beta$ -xilosidase (valores absolutos).

Neste trabalho, a análise das variáveis permitiu gerar um modelo matemático de primeira ordem, e o resumo da ANOVA para atividade enzimática com os termos significativos a 10% de probabilidade ( $p < 0,10$ ) estão apresentados na Tabela 6. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,68 e o teste F mostrou que o modelo é adequado para prever os resultados através de superfície de resposta. O modelo é apresentado na Equação 3, sendo que  $B$  representa bagaço de cevada,  $T$  temperatura e  $E$  extrato de levedura:

$$\hat{\beta} = 17,96 + 10,53B - 13,87T + 4,95E \quad (\text{Eq. 3})$$

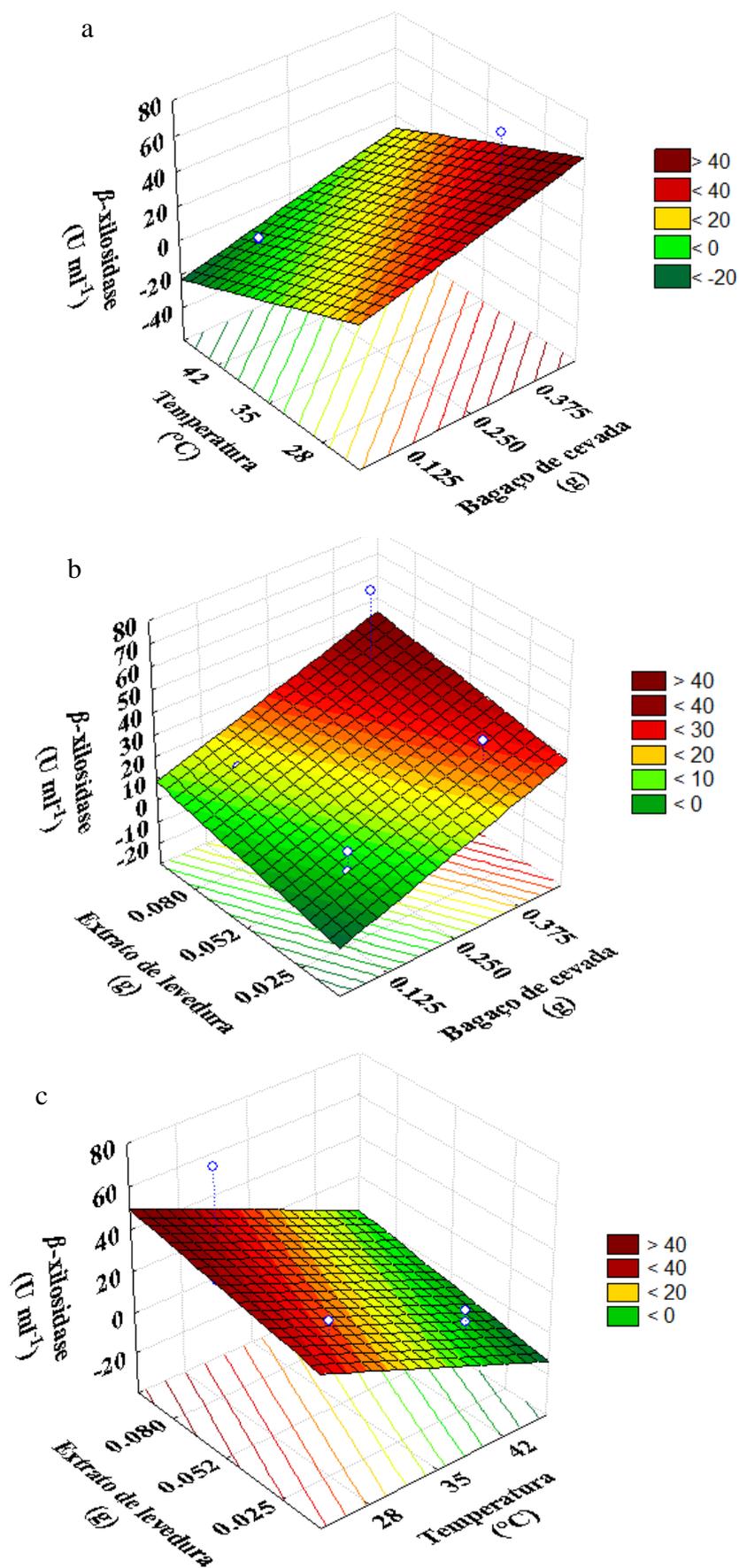
As superfícies de resposta do modelo (Equação 3) estão representadas na Figura 3 e mostram a relação entre temperatura, extrato de levedura e bagaço de cevada. Foi observado que, quanto menor a temperatura usada combinada a uma maior quantidade de bagaço de cevada, foi obtida uma maior atividade para  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* ( $40 \text{ U ml}^{-1}$ ) (Fig. 3a). No entanto, quando foram proporcionados aumentos constantes dos dois fatores, observou-se atividades de  $\beta$ -Xilosidase acima de  $40 \text{ U ml}^{-1}$  (Fig. 3b).

**Tabela 6** Resumo da ANOVA do modelo matemático de 1ª ordem para  $\beta$ -xilosidase

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc	Ftab
Regressão	2.624,442	3	874,81	5,13	3,07
Resíduos	1.192,580	7	170,37		
Total	3.817,022	10			

$R^2 = 0,68$ ;  $p$ -valor  $< 0,10$

Vale ressaltar que do ponto de vista de aproveitamento do reuso do resíduo agroindustrial que pode ser acumulado na natureza, é vantajoso otimizar um processo no qual uma quantidade maior de resíduo e menor de extrato de levedura sejam utilizadas, para que o processo industrial de síntese enzimática seja menos oneroso e maiores benefícios sejam trazidos ao meio ambiente. Finalmente, ao comparar extrato de levedura com temperatura, aumentando gradativamente a quantidade de extrato de levedura combinado a uma temperatura mais baixa, próximo de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , obtiveram-se quantidades maiores de  $40 \text{ U ml}^{-1}$  de  $\beta$ -Xilosidase (Fig. 3c).



**Fig. 3(a)** Superfícies de resposta quanto a produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e temperatura, **(b)** do extrato de levedura e bagaço de cevada e **(c)** da temperatura e extrato de levedura, sem os pontos axiais.

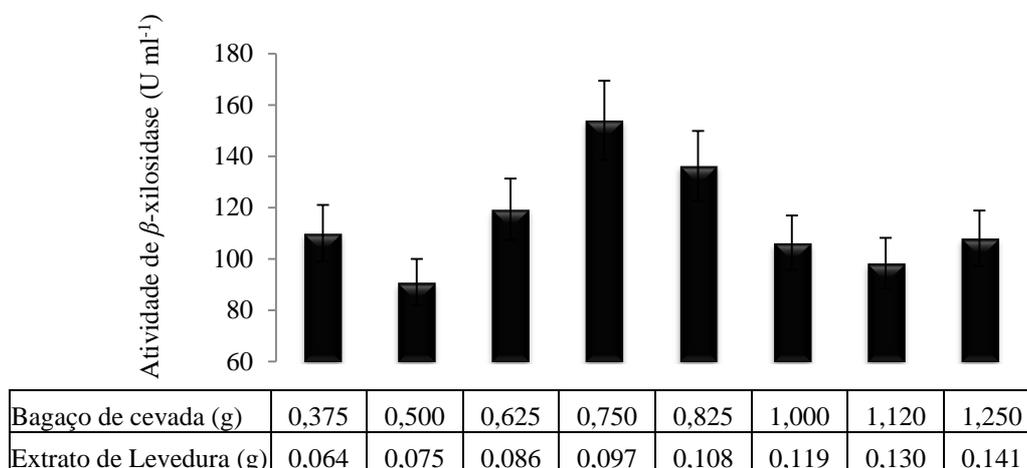
A produção de  $\beta$ -Xilosidase pelo fungo *Colletotrichum graminicola* quando em contato com farelo de trigo foi de 57,9 U ml<sup>-1</sup> quando cultivado a 65 °C por 72 horas com pH ótimo 5 [22]. Realizando a suplementação do meio de cultivo com 1% de casca de amendoim, houve um aumento na produção da enzima para 79 U ml<sup>-1</sup>. Com a aplicação do delineamento experimental, o fungo cresceu em meio contendo o resíduo casca de amendoim, otimizando a produção para 126 U ml<sup>-1</sup>, onde a temperatura não apresentou influência significativa quando comparada com outras variáveis independentes estudadas, como concentração do resíduo, tempo de cultivo e umidade inicial.

Em relação a estudos clássicos (não DCCR) realizados com enzimas xilanólíticas e celulolíticas com o fungo *A.fumigatus* por Sherief e colaboradores [23] em fermentação em estado sólido usando substratos mistos contendo palha de arroz com farelo de trigo em diferentes proporções, observou-se elevada produção enzimática após 4 dias de incubação em nível de umidade de 75 %, pH inicial de 5-6 a 40 °C na presença de NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio, obtendo-se atividades de 8,51 e 42,7 IU g<sup>-1</sup> para  $\beta$ -Glicosidase e Xilanase, respectivamente.

Com relação aos dados aqui apresentados, uma vez que o ponto ótimo não foi encontrado para a atividade enzimática de  $\beta$ -Xilosidase de *A.fumigatus* (PC-7S-2 M), foram realizados ensaios adicionais, combinando-se a máxima inclinação das superfícies, para gerar novos dados e definir um ponto de máxima produção da enzima. Os resultados dos ensaios realizados de acordo com a Tabela 3 estão apresentados na Figura 4. A melhor combinação foi o ensaio 4, quando as combinações foram: 0,750 g de bagaço de cevada e 0,097 g de extrato de levedura em 25 ml de meio Czapeck modificado, gerando uma atividade enzimática igual a 154,01 U ml<sup>-1</sup>. Deste modo, esta combinação foi adotada como ponto central para o 2º planejamento experimental denominado delineamento composto central rotacional (DCCR).

## 2º Planejamento experimental – Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A Tabela 7 apresenta valores usados em cada nível das variáveis e a matriz do planejamento 2<sup>3</sup> com a resposta da produção de  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* (PC-7S-2 M), observando que houve uma variação da produção desta enzima, de 150,86 a 252,26 U ml<sup>-1</sup>. De acordo com Abdeslahian e colaboradores [24], a produção máxima de  $\beta$ -Xilosidase foi de 6,13 U ml<sup>-1</sup> quando aplicada em um planejamento experimental utilizando *A. niger* cultivado em torta de dendê como substrato. Segundo Lenartovicz e co-autores [25], que usaram sabugo de milho em pó como fonte de carbono para cultivo e crescimento de outra cepa do fungo *A. fumigatus*, obtiveram 45 U ml<sup>-1</sup> de  $\beta$ -Xilosidase extracelular a uma temperatura de 42 °C por 72 horas.



**Fig. 4** Resultados obtidos da produção da atividade de  $\beta$ -xiliosidase em condições diferentes de bagaço de cevada e extrato de levedura.

**Tabela 7** Matriz do planejamento  $2^3$  com níveis dos fatores e produção de  $\beta$ -xiliosidase

Ensaio*	Níveis dos fatores					
	Bagaço de cevada (g)	%	Temperatura °C	Extrato de levedura (g)	%	$\beta$ -xiliosidase (U ml <sup>-1</sup> )
1	0,600	2,4	24	0,085	0,3	205,09
2	0,850	3,4	24	0,085	0,3	231,89
3	0,600	2,4	32	0,085	0,3	197,82
4	0,850	3,4	32	0,085	0,3	220,04
5	0,600	2,4	24	0,115	0,5	220,95
6	0,850	3,4	24	0,115	0,5	184,81
7	0,600	2,4	32	0,115	0,5	169,9
8	0,850	3,4	32	0,115	0,5	174,18
9	0,725	2,9	28	0,097	0,4	252,26
10	0,725	2,9	28	0,097	0,4	237,73
11	0,725	2,9	28	0,097	0,4	244,43
12	0,515	2,1	28	0,097	0,4	184,23
13	0,935	3,7	28	0,097	0,4	192,38
14	0,725	2,9	22	0,097	0,4	209,88
15	0,725	2,9	35	0,097	0,4	183,14
16	0,725	2,9	28	0,074	0,3	150,86
17	0,725	2,9	28	0,125	0,5	163,94

\* Ordem dos ensaios realizados aleatoriamente

Dados interessantes foram mostrados por Gottschalk et al. [26], que avaliaram a produção de  $\beta$ -Xilosidase pelo fungo *A. awamori*, em cultivo submerso a 30 °C com agitação de 200 rpm em meio suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de farelo de trigo, em uma faixa de pH entre 5,5 a 6,5. Utilizou-se diferentes fontes de nitrogênio como: extrato de levedura, nitrato de sódio, sulfato de amônia e ureia, obtendo-se uma produção alta da enzima no meio contendo ureia de 685 U l<sup>-1</sup> em 144 h de cultivo, e menor produção em extrato de levedura 210 U l<sup>-1</sup> em 168 h.

Em adição as análises feitas anteriormente, não foram encontrados trabalhos que mostrassem a produção de  $\beta$ -Xilosidase com o fungo *A. fumigatus* e o resíduo bagaço de cevada selecionado para conduzir experimentos de DCCR. Além dessas variáveis serem diferenciadas, a produção da enzima também foi otimizada aplicando um delineamento composto central rotacional, pobremente explorada nessa área de pesquisa, possibilitando a obtenção de valores elevados da enzima com ensaios estatísticos preliminares e durante a condução da atividade experimental.

A Tabela 8 apresenta a ANOVA (análise de variância) do modelo para descrever a variável estudada, produção de  $\beta$ -Xilosidase em função de bagaço de cevada, temperatura e extrato de levedura, a um nível de significância de  $p < 0,10$ , exaltando que foi possível obter um modelo preditivo.

A ANOVA foi usada para avaliar a significância do ajuste do modelo. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0,74, sendo considerado preditivo para o processo biológico estudado, prevendo a partir das variáveis bagaço de cevada, temperatura e extrato de levedura que representam a produção de  $\beta$ -Xilosidase. O modelo com os termos significativos estão representados na Equação 4. O F calculado da regressão (4,90) foi maior que o F tabelado (2,46) e, portanto, mostrou que o modelo quadrático selecionado foi significativo para o experimento realizado. A falta de ajuste do modelo foi averiguada a partir do F calculado de 8,26 e o F tabelado de 9,37, sendo que o F calculado foi menor que o F tabelado, representativamente tem-se que não há falta de ajuste no modelo matemático.

$$\hat{\beta} = 242,88 - 14,07B^2 - 7,61T - 13,69T^2 - 6,24E - 25,02E^2 - 10,37BE \quad (\text{Eq. 4})$$

**Tabela 8** Resumo da ANOVA do modelo matemático de 2ª ordem para a produção de  $\beta$ -xilosidase

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc	Ftab
Regressão	10.589,578	6	1.764,930	4,900	2,46
Resíduos	3.601,789	10	360,179		
F ajuste	3.496,015	8	437,002	8,263	9,37
Erro puro	105,773	2	52,887		
Total	14.191,367	16			

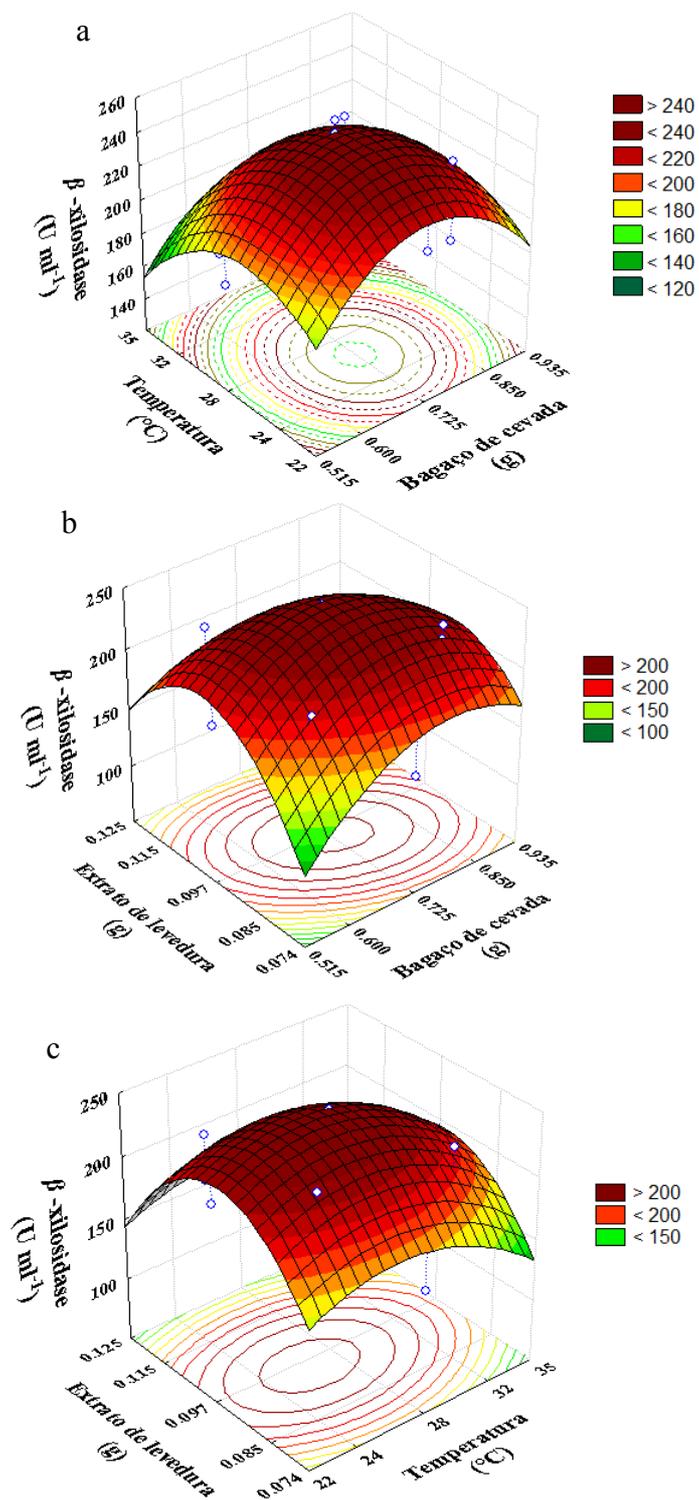
$R^2 = 0,74$ ;  $p$ -valor  $< 0,10$

As superfícies respostas geradas representam o modelo matemático que possibilita verificar a combinação dos três fatores analisados no experimento, a influência de cada um e a atividade máxima da enzima  $\beta$ -Xilosidase (Figura 5). As condições de maior produção de  $\beta$ -Xilosidase são obtidas nas concentrações que estão próximas da condição do ponto central para os três fatores estudados, embora apresente regiões de curvas de contorno que indicam valores um pouco menores do ponto central para as três variáveis e que levam as mesmas respostas.

Portanto, é importante a etapa de validação dos dados para confirmar estes que foram obtidos nesta representação gráfica, a fim de se obter as condições ideais e, assim, possibilitar a formulação da composição do meio que leve à máxima produção de  $\beta$ -Xilosidase pelo fungo com o mínimo custo final do processo, pois utiliza um número reduzido de ensaios, sem perder a qualidade de informação dos resultados. A Figura 6 apresenta a regressão do modelo que ilustra as variáveis independentes e os efeitos interativos nos gráficos de superfície de resposta.

Observa-se na Figura 5(a) melhor interação de temperatura com bagaço de cevada, onde o ponto ótimo localiza-se na faixa de temperatura de 24 a 28 °C combinado com 0,725 g de bagaço de cevada, sendo a desejabilidade de produção de  $\beta$ -Xilosidase maior que 240 U ml<sup>-1</sup>. Logo na Figura 5(b), condições ótimas de extrato de levedura e bagaço de cevada seriam 0,097 e 0,725 g, respectivamente, para a obtenção de valores superiores a 200 U ml<sup>-1</sup> da enzima, e, na Figura 5(c), a faixa de temperatura ideal de 24 a 28 °C, em que, combinada com 0,097 g de extrato de levedura, possibilitaria atingir a produção enzimática acima de 200 U ml<sup>-1</sup>.

O fato de ter-se verificado nesse trabalho valores para R<sup>2</sup> entre 0,68 e 0,74 (Tabelas 6 e 8) é justificado pelo fato do planejamento resultar em dados de três dimensões, e o R<sup>2</sup> agrega dados de duas dimensões, deste modo, há sempre um fator fora de ajuste, raramente obtêm-se valores acima de 0,90 para R<sup>2</sup> em planejamentos experimentais. O planejamento não é avaliado apenas pelo R<sup>2</sup>, deve-se também observar a tendência dos resultados, que neste caso foi comprovado ser estatisticamente significativo, pois o F calculado foi maior que o F tabelado (Tabela 6). Indubitavelmente, foi possível comprovar que o modelo proposto é válido, gerando os modelos matemáticos de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ordem (Equações 3 e 4, respectivamente) que foram representados nos gráficos de superfícies (Figuras 3 e 5).



**Fig. 5** Superfícies de resposta quanto à produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e da temperatura (a), do extrato de levedura e bagaço de cevada (b) e da temperatura e extrato de levedura (c)

## Otimização

Após a obtenção das condições que maximizam a produção da enzima de interesse, é necessário analisar também o comportamento individual das respostas para certificar, assim, que todas elas estão em regiões aceitáveis com todas as restrições satisfeitas. Assim, é necessário realizar experimentos confirmatórios nas condições ideais selecionadas.

As condições ótimas para a produção de  $\beta$ -Xilosidase apresentadas no gráfico de desejabilidade (Figura 6) permitem selecionar os pontos ótimos para a produção desta enzima, na qual a combinação entre os fatores analisados possibilita a formulação do meio e das condições de cultivo com pontos ótimos nas condições adequadas que levam à máxima produção da proteína de interesse [9]. Observa-se que há uma faixa ótima para bagaço de cevada e temperatura maior do que a faixa de valores para extrato de levedura, mostrando que aumentando quantidades mínimas de extrato de levedura, a produção da enzima decai rapidamente, com bagaço de cevada e temperatura a sensibilidade é menor, diminui a produção mais lentamente.

Assim, a adição ao meio da quantidade ótima de bagaço de cevada (0,730 g), cultivado na temperatura ótima (27 °C) com 0,100 g de extrato de levedura é a condição propícia para a obtenção de maior quantidade da enzima, pois, ao alterar quantidade de extrato de levedura na faixa de 0,100g para 0,125g, a produção enzimática diminui bruscamente.

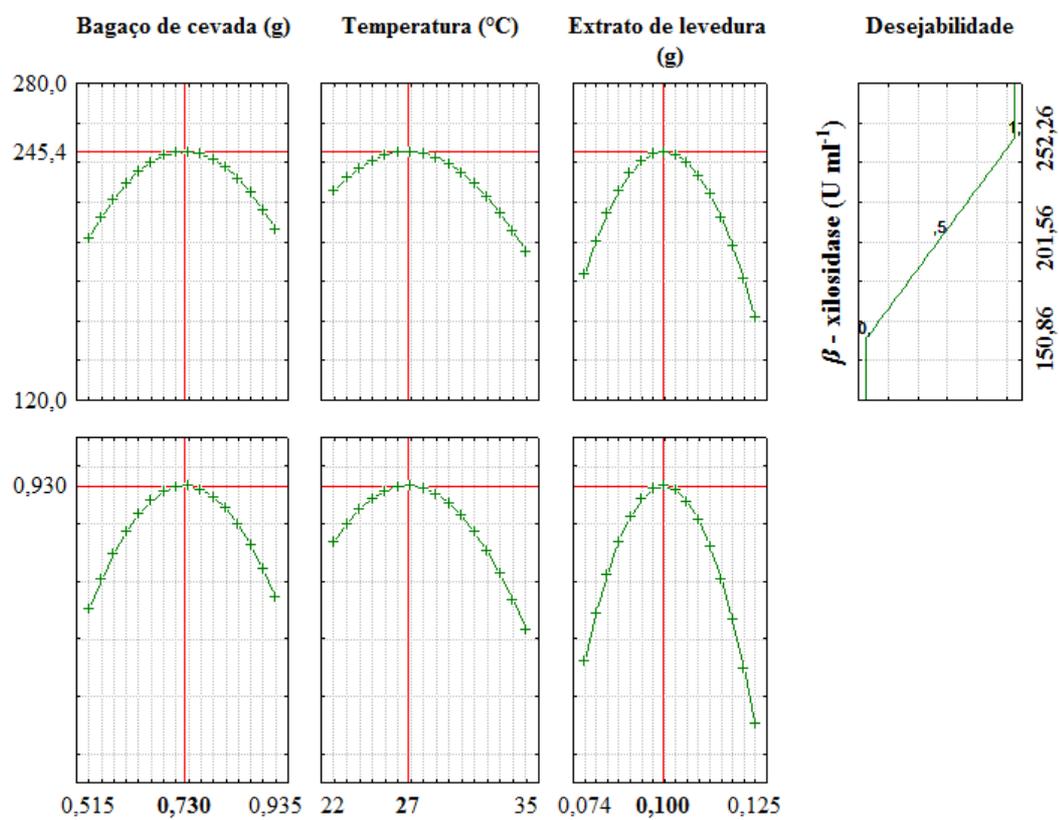
## Validação das condições experimentais otimizadas

As condições definidas no experimento foram validadas, ensaiando-se 6 repetições nas dosagens, realizando em duplicatas, nas seguintes condições: bagaço de cevada 0,730 g, temperatura de 27 °C e 0,100 g de extrato de levedura. Os cultivos foram incubados por 4 dias de crescimento em meio líquido sem agitação, como proposto inicialmente, e em seguida foram realizadas as dosagens de  $\beta$ -Xilosidase conforme protocolo estabelecido em Materiais e Métodos.

A validação dos dados mostrou um resultado experimental com média de produção de  $\beta$ -Xilosidase de 229,06 U ml<sup>-1</sup>, sendo o resultado predito pelo modelo de 245,04 U ml<sup>-1</sup>. Desta forma, o planejamento experimental foi extremamente relevante para a melhoria da atividade enzimática do isolado fúngico *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) na presença de bagaço de cevada. Inicialmente, apenas com crescimento e cultivo clássico, sem aplicação do delineamento experimental, foi obtido 15 U ml<sup>-1</sup> de  $\beta$ -Xilosidase para este microorganismo. Após a aplicação do planejamento experimental nas condições e variáveis estudadas discutidas anteriormente, foi possível diminuir gastos com materiais, reagentes e, tempo de experimento, e obteve-se um aumento médio da atividade de  $\beta$ -Xilosidase para 229,06 U ml<sup>-1</sup>, isto é, a produção da enzima

de interesse foi melhorada em 1,500%. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro registro de atividades enzimáticas tão significativas para  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* usando bagaço de cevada como fonte de carbono.

A descoberta de novas linhagens fúngicas com capacidade de produção de enzimas pode agregar conhecimento científico com o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis e ambientais. Nesse trabalho foi isolado uma cepa (PC 7S 2 M) completamente nova, de um ambiente cuja biodiversidade é praticamente inexplorada, o qual compreende a região oeste do Paraná. Os resultados aqui apresentados forneceram uma contribuição positiva para o levantamento dessa biodiversidade. Além disso, indicaram que a enzima produzida, poderia ser testada para fins biotecnológicos, uma vez que é produzida em altos níveis, levando o aproveitamento indiscutível de um resíduo de cervejaria abundante no Brasil, contribuindo, assim, para a diminuição de seu acúmulo no ambiente.



**Fig. 6** Condições ótimas e desejáveis para a produção de  $\beta$ -xilosidase.

## Conclusões

O melhor substrato para alta produção da atividade enzimática dentre os ensaios realizados foi o bagaço de cevada, até o momento não usado para  $\beta$ -Xilosidase no gênero *Aspergillus*. Esta enzima em extrato bruto apresentou temperatura ótima de 45 °C e pH ótimo de 5.5. A aplicação do planejamento experimental foi efetiva para a otimização da produção de  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus*, levando à produção de altos níveis enzimáticos nas condições ótimas definidas, aumentando a produção inicial da enzima de 15 U ml<sup>-1</sup> para 229,06 U ml<sup>-1</sup> ao final da aplicação do delineamento experimental, correspondendo a 1.500 % de melhora na eficiência da atividade enzimática. A aplicação do DCCR permitiu que fosse alcançado 93,47% do modelo predito. Assim, pode-se afirmar que a  $\beta$ -Xilosidase de *A. fumigatus* (PC-7S-2 M) é uma enzima interessante para se testar sua aplicação em processos industriais e biotecnológicos diversos.

**Agradecimentos**

A estudante F.G.N. Vieira foi bolsista da Capes. R.C.G. Simão foi parcialmente financiada pela Fundação Araucária. Este trabalho fez parte da rede SISBIOTA (Bioprospecção de Fungos Filamentosos Visando Aplicação de Holoenzimas em Biorrefinaria) e recebeu apoio financeiro do CNPQ-MCT para sua execução. Todos os autores deste trabalho concordam com a submissão destes resultados para o periódico "Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology".

## Referências

- Liu C, Tao S, Du JH, Wang J (2008) Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. *Journal Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:703-711
- Teng C, Jia H, Yan Q, Xhou P, Jiang Z (2011) High-level expression of extracellular secretion of a  $\beta$ -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* 102:1822-1830
- Lasrado LD, Gudipati M (2013) Purification and characterization of  $\beta$ -d-xylosidase from *Lactobacillus brevis* grown on xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 92:1978-1983
- Souza DB, Brito GCB, Vasconcelos FCW, Braga LC (2010) Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de estudos ambientais* 12:38-46
- Santos TC, Rocha TJO, Oliveira AC, Filho GA, Franco M (2013) *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). *Arq. Inst. Biol.* 80:65-71
- Wongwisansri S, Promdonkoy P, Matetaviparee P, Roongsawang N, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2013) High-level production of thermotolerant  $\beta$ -xylosidase of *Aspergillus sp.* BCC125 in *Pichia pastoris*: Characterization and its application in ethanol production. *Bioresource Technology* 132:410-413
- Santaella ST, Junior FCGS, Gadelha DAC, Costa KO, Aguiar R, Arthaud IDB, Leitão RC (2009) Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. *Engenharia sanitária ambiental* 14:139-148
- Saqib AAN, Hassan M, Khan NF, Baig S (2010) Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry* 45:641-646
- Rodrigues IM, Iemma AF (2009) Planejamento de experimentos & otimização de processos. Campinas, São Paulo
- IAP – Instituto Ambiental do Paraná (2006) Plano de Manejo do Parque Estadual Cabeça do Cachorro. Curitiba: SEMA
- Simão, RCG, Souza CGM, Peralta RM (1997) Induction of xylanase in *Aspergillus tamari* by methyl  $\beta$ -D-xylosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:267-271.
- McIlvaine, TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal Biological Chemistry* 49:183-186
- Saini J, Anurag RK, Arya A, Kumbhar BK, Tewari L (2013) Optimization of saccharification of sweet sorghum bagasse using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 44:211-219
- Sukhbaatar B, Hassan EB, Kim M, Steele P, Ingram L (2014) Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 101:196-202
- Walia A, Mehta P, Chauhan A, Shirkot CK (2013) Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium sp.* CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. *Annals of Microbiology* 63:187-198
- Córdova FJC, León AMG, Regalado ES, González MNS, Ramírez TL, Avalos BCG, Medrano JAL (2012) Experimental design for the optimization of copper biosorption from aqueous solution by *Aspergillus terreus*. *Journal of Environmental Management* 95:S77-S82
- Michelin M, Polizeli MLTM, Ruzene DS, Silva DP, Ruiz HA, Vicente AA, Jorge JA, Terenzi HF, Teixeira JA (2012) Production of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:1185-1192
- Benassi VM, Lucas RC, Michelin M, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2012) Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. *Brazilian Journal of food technology* 15:253-260
- Omardien S (2013) Bioprospecting for  $\beta$ -glucosidases and  $\beta$ -xylosidases from non-*Saccharomyces* yeast. In: Thesis presented in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in the Faculty of Natural Science at Stellenbosch University. Disponível em: <http://scholar.sun.ac.za>. Acessado 20 Abril 2014
- Knob A, Carmona EC (2009) Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum* *New Biotechnology* 26
- Vaithanomsat P, Songpim M, Malapant T, Kosugi A, Thanapase W, Mori Y (2011) Production of  $\beta$ -glucosidase from a newly isolated *Aspergillus* species using response surface methodology. *International Journal of Microbiology*
- Zimbaridi ALRL, Sehn C, Meleiro LP, Souza FHM, Masui DC, Nozawa MSF, Guimarães LHS, Jorge JA, Furriel RPM (2013) Optimization of  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *International Journal of Molecular Sciences* 14:2875-2902

23. Sherief AA, El-Tanash, AB, Atia N (2010) Cellulase Production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Research Journal of Microbiology* 5:199-211
24. Abdeshahian P, Samat N, Yusoff WMW (2010) Production of  $\beta$ -Xylosidase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 Using Palm Kernel Cake in a Packed-Bed Bioreactor. *Journal of Applied Sciences* 10:419-424
25. Lenartovicz V, Souza CGM, Moreira FG, Peralta RM (2003) Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable  $\beta$ -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 38:1775-1780
26. Gottschalk LMF, Paredes RS, Teixeira RSS, Silva ASA, Bon EPS (2013) Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase,  $\beta$ -xylosidase, ferulic acid esterase and  $\beta$ -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Brazilian Journal of Microbiology* 44:569-576

### Legendas das figuras

**Fig. 1 (a)** Atividade de  $\beta$ -xilosidase intracelular de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) após 10 dias de cultivo a 28 °C em 25 mL de meio Czapeck líquido modificado sob agitação (120 rpm) (colunas negras) e no mesmo meio mantido em estado estacionário (colunas brancas) usando como fonte de carbono diferentes resíduos provenientes da agroindústria na concentração final de 1% (w/v). **(b)** Dosagem de  $\beta$ -xilosidase intracelular de micélios de *A. fumigatus* (cepa PC-7S-2) crescidos em cultivo líquido estacionário durante 7 dias usando o resíduo bagaço de cevada 1% (w/v) como fonte de carbono. Os experimentos foram feitos em duplicata e as dosagens em triplicata. Assim, as barras de erro representam as médias de três resultados independentes.

**Fig. 2** Comparação dos resultados dos efeitos lineares para a produção de  $\beta$ -xilosidase (valores absolutos)

**Fig. 3 (a)** Superfícies de resposta quanto a produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e temperatura, **(b)** do extrato de levedura e bagaço de cevada e **(c)** da temperatura e extrato de levedura, sem os pontos axiais.

**Fig. 4** Resultados da produção da atividade de  $\beta$ -xilosidase em 8 condições diferentes de bagaço de cevada e extrato de levedura

**Fig. 5** Superfícies de resposta quanto a produção de  $\beta$ -xilosidase em função do resíduo bagaço de cevada e temperatura (a), do extrato de levedura e bagaço de cevada (b) e da temperatura e extrato de levedura (c)

**Fig. 6** Condições ótimas e desejáveis para a produção de  $\beta$ -xilosidase